Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F. R. C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Der Einfluß von LH-RH und einem seiner superaktiven Analoga auf den Serum-Gonadotropinspiegel und auf den Androgen-Metabolismus im Hoden männlicher Ratten in verschiedenen Stadien der sexuellen Reife

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
ALBERT JOSEF BRAUN
aus Riedlingen

1985

KGL. BIBLIOTHEEK

Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F. R. C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Der Einfluß von LH-RH und einem seiner superaktiven Analoga auf den Serum-Gonadotropinspiegel und auf den Androgen-Metabolismus im Hoden männlicher Ratten in verschiedenen Stadien der sexuellen Reife

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
ALBERT JOSEF BRAUN
aus Riedlingen

1985

Dekan:	Professor Dr. W. Schulte
1. Berichterstatter:	Professor Dr. D. Gupta
2. Berichterstatter:	Professor Dr. J. Seif

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

Meiner Frau und meinen Eltern
dankbar gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I	EINLEITUNG	1
II	PROBLEMSTELLUNG	7
III	METHODE	8
1.	Versuchstiere	8
2.	Materialien	9
2.1	Substrat	9
2.2	Nicht radioaktive Referenzsteroide	9
2.3	Injektionsmedien	1o
2.4	Inkubationsmedium	1o
2.5	Chemikalien und wichtige Geräte	11
2.5.1	für den tierexperimentellen Teil	11
2.5.2	für den laborchemischen Teil	11
	a) für die Inkubation	11
	b) für die Extraktion	12
	c) für die Dünnschichtchromatographie	12
	d) für die Messung der Radioaktivität	12
	e) für den Radioimmunassay zur Bestimmung von LH und FSH im Serum	13
3.	Versuchsdurchführung	15
3.1	Tierexperimenteller Teil	17
3.2	Inkubation	17
3.3	Extraktion	18
3.4	Dünnschichtchromatographie	2o
3.4.1	Große Dünnschichtchromatographie	2o
3.4.2	Azetylierung und kleine Dünnschicht-chromatographie	23
3.5	Einstellung des Scintillation-Spectrometers	26
3.6	Validität der Methode	26
3.6.1	Sensitivität der Methode	26

Seite

3.6.2 Präzision der Methode 28
3.6.3 Recovery 28
3.7 Radioimmunassay (RIA) zur Bestimmung von LH und FSH 29
3.7.1 Prinzip des RIA 29
3.7.2 Durchführung des RIA 3o
3.7.3 Jodierung von rLH und rFSH nach der Chloramin-T-Methode 33
3.7.4 Inter- und Intraassay Variation 36

IV ERGEBNISSE 37

1. Statistische Datenauswertung 37
1.1 Angeführte statistische Größen 37
2. Ergebnisse der Serumgonadotropine 38
2.1 Ergebnisse der FSH-Serumspiegel 38
2.2 Ergebnisse der LH-Serumspiegel 41
3. Ergebnisse der Metabolisierung des ^{3}H-Androstendions und des ^{14}C-Testosterons 45
3.1 Ergebnisberechnung 45
3.2 Anmerkung zu versuchsspezifischen Umständen 46
3.3 Darstellung der Ergebnisse 47
3.4 Altersabhängige Metabolisierung von ^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T, Ergebnisse der Kontrollgruppe (N-Behandlung) 65
3.5 Einfluß der LH-RH-Stimulation auf die Biokonversion von ^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T (L-Behandlung) 67
3.5.1 Bildung von DHT 68
3.5.2 Bildung von DIOL 69
3.5.3 Bildung 5α-reduzierter Metabolite 69
3.6 Einfluß der superaktiven LH-RH-Stimulation in der Konzentration o,o4 µg/1oog KG auf die Biokonversion von ^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T (S-Behandlung) 7o
3.6.1 Bildung von DHT 71

		Seite
3.6.2	Bildung von DIOL	72
3.6.3	Bildung 5α-reduzierter Metabolite	72
3.7	Einfluß der superaktiven LH-RH-Stimulation in der Konzentration o,4µg/1oog KG auf die Biokonversion von ^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T (SS-Behandlung)	73
3.7.1	Bildung von DHT	74
3.7.2	Bildung von DIOL	75
3.7.3	Bildung 5α-reduzierter Metabolite	76
3.8	Biokonversion von ^{3}H-Δ-4 zu ^{3}H-T unter dem Einfluß der verschiedenen Stimulationen	77
3.9	Verhältnis von Androstendion und Testosteron zu den 5α-reduzierten Metaboliten	81
V	DISKUSSION	84
1.	Diskussion der Ergebnisse der Serum-gonadotropine	84
2.	Diskussion des Androgenmetabolismus	86
2.1	Bewertung der angewandten Methode	86
	ad in-vivo-Vorbehandlung	86
	ad Inkubation	88
	ad Extraktion und chromatographische Trennung	91
2.2	Bewertung der Biokonversion	92
VI	ZUSAMMENFASSUNG	98
VII	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	1o1
VIII	LITERATURVERZEICHNIS	1o2

I EINLEITUNG

Die endokrine und exokrine Funktion des Hodens ist wohl bekannt, aber die komplexen hormonalen und neurohormonalen Prozesse, welche die testikuläre Funktion regulieren, sind immer noch nur zum Teil verstanden (8). Eine schematische Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse, in der negative Rückkopplungsmechanismen eine auffallende Rolle in der Modulation der hormonalen Sekretion spielen, veranschaulicht Abb. 1.

Im Laufe der sexuellen Reifung kommt es zu Veränderungen auf jeder Ebene dieser dynamischen ZNS-Gonaden-Achse. Doch wird angenommen, daß die Hauptveränderung, welche Pubertät auslöst, sich im Hypothalamus vollzieht (22). Nach einer neueren Hypothese soll sich während des sexuellen Reifeprozesses die Sensitivität der hypothalamischen und hypophysären Feedback-Zentren gegenüber den gonadalen Steroiden verändern (22,25). Odell et al. sehen auf Gonadenebene einen wesentlichen Faktor für das Ingangkommen der Pubertät. Sie vermuten, daß die Gonadotropin-Zielzellen ihre Empfindlichkeit auf die LH- und FSH-Stimulation altersabhängig verändern (46,47). Hinweise dafür liefert auch die Arbeit von Rommerts und Brinkmann (54).

Durch zahlreiche Studien nachgewiesen ist die vermehrte Sekretion der Gonadotropine und der Geschlechtshormone mit dem Einsetzen der Pubertät (12,19,21,23,24,32,4o,46,49,55,63). Parallel zu diesen altersabhängigen Änderungen der Plasmahormonkonzentrationen wandelt sich auch die Biokonversion der Androgene in den Zielorganen. In Metabolismusstudien mit Hodengewebe demonstrieren viele Autoren bei präpubertären Ratten ein starkes Auftreten der 5α-reduzierten Folgeprodukte des Testosterons, die ein Maximum bei pubertierenden Ratten zeigen und mit steigendem Alter wieder stark abnehmen (15,16, 21,26,31,32,35,36,38,43,44,45,48,49,51,52,62).

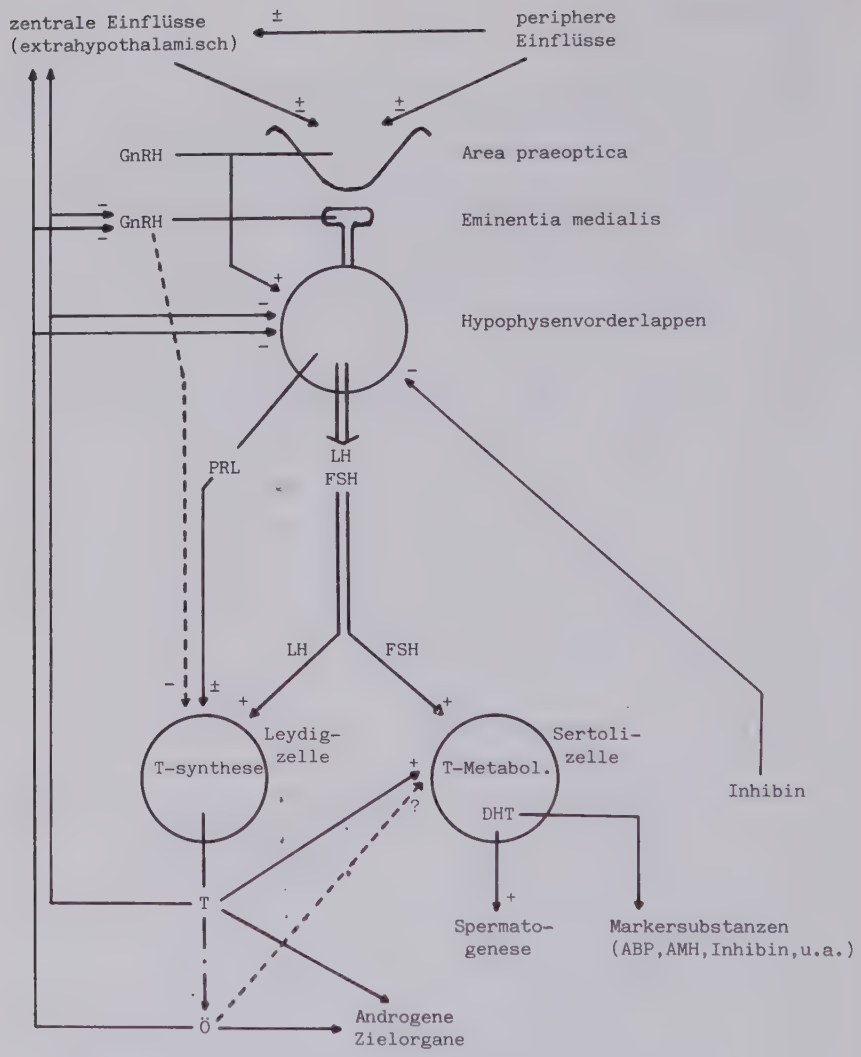


Abb. 1: Hormonales Regulationsschema der Testikel, modifiziert nach J. Tamm (65;5,13,22,34)

(+ = fördernde, - = hemmende Einflüsse; ABP = Androgenbindendes Protein; AMH = Anti-Müllerhormon; DHT = Dihydrotestosteron; FSH = Follikelstimulierendes Hormon; GnRH = Gonadotropin Releasing Hormon; LH = Luteinisierendes Hormon; Ö = Östradiol; PRL = Prolactin; T = Testosteron)

Testosteron wird über zwei Wege, die miteinander verknüpft sind, metabolisiert. Zum einen über den 17-Hydroxy-Weg und zum anderen über den 17-Keto-Weg (Kennzeichen: in Position 17 eine OH-Gruppe bzw. Keto-Gruppe). Im 17-OH-Weg ist die 5α-Reduktase das Schlüsselenzym, welches T zum DHT reduziert. Die 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase nimmt die Schlüsselposition für den Abbau im 17-Keto-Weg ein. Der Hauptmetabolismus erfolgt über den Stoffwechselweg vom Androstendion über T zum DHT und weiter zum Diol (16,6o,62, 65). Siehe Abb. 2.

Verschiedene Autoren weisen eine Stimulierbarkeit des 5α-Reduktase-Systems durch Gonadotropine nach. Nayfeh et al. (43) konnten zeigen, daß die 5α-Reduktase-Aktivität im unreifen Rattenhoden - untersucht in vitro unter linearen kinetischen Bedingungen - nach Hypophysektomie abnimmt und wieder zunimmt unter in vivo Behandlung mit LH oder FSH. Bei inkubierten Hypophysen finden Massa et al. (37) durch Zugabe von FSH ins Inkubationsmedium ebenfalls eine Zunahme der 5α-Reduktase - Aktivität; jedoch bewirkt die LH-Zugabe keine Aktivitätsveränderung.

Untersuchungen aus dem Hormonlabor (22, 27) lassen eine Abhängigkeit der 5α-Reduktase von LH-RH vermuten. Die in vitro Biotransformation von T in Hypophysen bei verschieden alten Ratten nach vorausgegangener Orchidektomie ergeben eine deutliche Zunahme der 5α-reduzierten Produkte, während die Bildung von Androstendion nicht beeinflußt wurde. Aus der signifikanten Beziehung zwischen dem Anstieg der zirkulierenden Gonadotropine und der vermehrten Bildung 5α-reduzierter Metabolite ohne Androstendion-Anstieg wurde geschlossen, daß die Kastration und der damit verbundene LH-RH-Anstieg (8) das 5α-Reduktase-System und nicht das der 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase aktiviert.

Angeregt durch diese Beobachtung versucht die vorliegende Studie an Hand der in vitro Biokonversion von T und Δ-4 herauszufinden, wie exogen verabreichtes LH-RH bei männlichen Ratten in verschiedenen Stadien der sexuellen Reife das

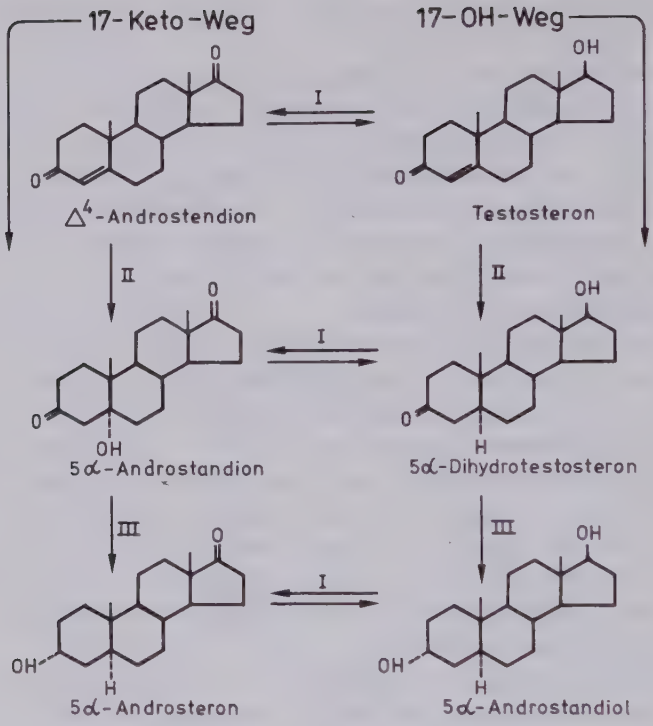


Abb. 2: Abbauwege des Testosterons, entnommen aus Shanies et al. (60)

Zeichenerklärung:

I = 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
(= 17β-Ketosteroid-Reduktase)
Cofaktor: NAD(P)H + H

II = 5α-Reduktase
(= 5α-Hydrogenase)
Cofaktor: H_2 · Akzeptor

III = 3α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
(= 3α-Oxidoreduktase)
Cofaktor: NAD(P)H + H

gonadale 5α-Reduktase- und 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Enzymsystem beeinflußt. In der gleichen Versuchsanordnung wird parallel dazu die Wirkung eines superaktiven LH-RH-Analogons in zwei Dosierungen auf den Androgen-Metabolismus untersucht.

Die Isolierung und Strukturaufklärung von LH-RH durch Schally und Mitarbeiter im Jahre 1971 (59) und der geglückten synthetischen Herstellung dieses Dekapeptids (18) führte zu einer systematischen Erforschung des Releasing-Hormons. Das gefundene LH-RH setzte sowohl LH als auch FSH aus der Hypophyse frei (12,57,59) und wird daher später auch als GnRH (=Gonadotropin-Releasing-Hormon) bezeichnet. Wahrscheinlich existiert für LH-RH keine Artspezifität, da das natürliche wie auch das synthetische LH-RH in vielen Labor- und Haustieren, in Vögeln, bei einigen Fischarten sowie im Menschen die Sekretion von FSH und LH hervorruft (58).

Die Synthese unzähliger LH-RH-Analoga mit größerer Potenz, längerer Wirkungsdauer und verändertem Muster der Spezifität bis hin zum Antagonisten erhellte die Beziehung zwischen Peptidstruktur und Funktion (63,66): siehe Legende der Abb. 3. Das im Experiment angewandte LH-RH-Analogon wurde 1974 entwickelt (1o). Die Potenzsteigerung und Wirkungsverlängerung kommt durch das Einführen der D-Aminosäure in Position 6 und durch Äthylamid in Position 1o zustande.

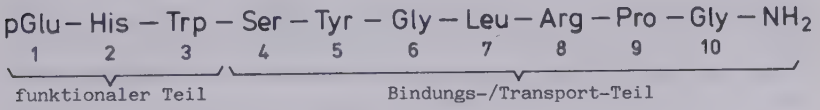


Abb. 3: Aminosäurensequenz von LH-RH

Die Aminosäuren in Position 1 bis 3 sind verantwortlich für die spezifische Aktivität, ihr Austausch bzw. Fehlen führt zu LH-RH-Antagonisten.
Die Positionen 4 bis 1o sind die Stellen der Bindung des Peptids an LH-RH-Rezeptoren bzw. an Transportproteine. Das Einführen von D-Aminosäuren (z. B. D-Ala, D-Leu, D-Ser, D-Trp) in Position 6 sowie der Ersatz des Glycinamids in Position 1o durch Äthyl- oder Propylamid bewirkt vorallem eine Potenzsteigerung. Me-Leu in Position 7 verlängert die Wirkung.
(aus: 42;6,58,66)

Inzwischen gilt als gesichert, daß die in vivo Verabreichung von LH-RH und seiner agonistischen Analoge paradoxerweise Antifertilitätseffekte in beiden Geschlechtern verschiedener Tierarten ausübt (2,4,6,7,28,29,3o,53,54). Initial steigt zwar noch die T-Produktion an (2,5,7,9), aber nach ein bis zwei Tagen wird die antitestikuläre Wirkung evident (5,7). Die antigonadalen Effekte wiederholter Releasing-Hormon-Gabe zeigen sich in einer Abnahme der Anzahl testikulärer LH- und Prolactinrezeptoren, begleitet von einer verminderten Androgenproduktion, die in der Dysfunktion der Tubuli seminiferi gipfelt. Heber und Swerdloff (28) erreichen mit der kombinierten Gabe von LH-RH und T bei Ratten eine männliche Kontrazeption.
Anfänglich wurden diese Antifertiltätseffekte des LH-RH als eine Folge der "down-regulation" (4) der LH-Rezeptoren angesehen, als Ergebnis der exzessiven LH-Sekretion. Jedoch zeigen neuere Studien (2,7,28,3o), daß LH-RH auch in hypophysektomierten Tieren die LH-Rezeptoren reduziert und die T-Produktion hemmt. Der endgültige Nachweis für einen direkten Effekt von LH-RH und seiner Antagonisten auf die testikuläre Funktion wurde erbracht, indem spezifische LH-RH-Rezeptoren in Membranfraktionen des interstitiellen Hodengewebes gefunden wurden (5).
Die LH-RH-Gabe im Experiment wirkt also auf den testikulären Androgenmetabolismus in mindestens zweifacher Weise:
zum einen werden aus der Hypophyse vermehrt LH und FSH freigesetzt, die die Steroidsynthese stimulieren und den T-Metabolismus beeinflussen, zum anderen wirkt das Releasing Hormon auch direkt auf das testikuläre Gewebe.

II PROBLEMSTELLUNG

Aus dem Hormonlabor der Universitäts-Kinderklinik Tübingen liegen im Rahmen der Pubertätsforschung bereits eine ganze Reihe von Untersuchungen über den Androgenmetabolismus heranreifender Ratten vor. Mehrfach wurde dabei die Altersabhängigkeit des 5α-reduzierenden Systems bestätigt. Eine Stimulierbarkeit der 5α-Reduktase-Aktivität durch Gonadotropine wurde dabei angenommen, welche andere Autoren (37,43) ebenfalls nachweisen konnten.
Die vorausgegangene Untersuchung von Gupta et al. (27) ließ außerdem vermuten, daß die nach Kastration erhöhte Ausschüttung von LH-RH die Aktivität der 5α-Reduktase steigert. Durch diese Beobachtung angeregt geht die vorliegende Studie den Fragen nach:

- Wie verändert sich der Androgenmetabolismus, insbesondere die 5α-Reduzierung, im Rattenhoden in verschiedenen Stadien der sexuellen Entwicklung nach Gabe von LH-RH?
- Welche Wandlungen in der Androgenbiokonversion bewirkt im gleichen Versuchsmodell die Gabe eines LH-RH-Analogons mit stärkerer biologischer Aktivität?

Zur Klärung dieser Fragen werden 2o, 35, 5o und 9o Tage alte Ratten in 4 Behandlungsgruppen eingeteilt: Kontrollgruppe, L-Gruppe (LH-RH: i.p. o,4µg/1oog KG), S- und SS-Gruppe (superaktives LH-RH: i.p. o,o4 und o,4µg/1oog KG). 3o Minuten nach der Releasing-Hormon-Gabe werden FSH und LH im Serum untersucht und die Hoden inkubiert. Als Substrat dient jeweils ^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T, da der unreife Hoden vorwiegend Δ-4 und ähnlich schwach androgen-wirksame Steroide synthetisiert, der reife Hoden dagegen T (25). Nach der Inkubation wird die Radioaktivität von T, Δ-4, DIOL, DHT, DION und A-steron bestimmt.
Bei den gleichen Tieren studiert Baur (3) mit der gleichen Versuchsanordnung die Androgenbiokonversion in der Hypophyse. Beide Arbeiten zusammen sollen Aufschlüsse über die Sofortwirkung von Gonadotropin-Releasing Hormonen auf den Testosteronmetabolismus während der sexuellen Reife liefern.

III METHODE

1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Wistar-Ratten aus der Zucht Ivanovac, Kisslegg/Allgäu. Die Tiere wurden - unter Berücksichtigung des jeweiligen Alters - so im voraus bestellt, daß sie zwei Tage lang Zeit hatten, sich vom Versandstreß zu erholen und sich in ihrem neuen Käfig einzugewöhnen, bevor der Versuch begonnen wurde.
Die Anzahl der Tiere ergab sich wie folgt: Für jede Injektionsart (insgesamt 4, siehe Problemstellung) wurde der gesamte Versuch sechsmal durchgeführt. Bei den 9o Tage alten Ratten genügte jeweils ein Einzeltier. Bei den jüngeren Ratten mußte man jedoch die Hoden mehrerer Tiere zu einen Pool vereinigen, um ausreichend viel Hodengewebsmenge für die Inkubation zu erhalten. Da für die Paralleluntersuchung (3) ebenfalls die Hypophysen mehrerer junger Tiere gepoolt werden mußten, konnten im Experiment bei den 2o Tage alten Ratten die Hoden von 6 Einzeltieren, bei den 35 Tage alten Tieren die Hoden von 3 und bei den 5o Tage alten Ratten die Hoden von 2 Einzeltieren in einem Pool zusammengefügt werden.

Tab. 1: Angaben über die Versuchstiere, Zahl der Tiere pro Pool

Alter (Tage)	Ratten pro Pool (Einzeltiere)	Geamtzahl der Ratten	ø Körpergewicht (g)	ø Hodengewicht (mg)
2o	6	144 (=4x6x6)	26,o	76,5
35	3	72 (=4x3x6)	75,3	314
5o	2	48 (=4x2x6)	149,3	926
9o	1	24 (=4x1x6)	257,o	1232

2. Materialien

2.1 Substrat

Androst-4-ene-3,17-dione (1,2-^{3}H) mit einer spezifischen Aktivität von 45 Ci/mmol und einem Molekulargewicht von 286,4 g, sowie Testosterone (4-^{14}C), spezifische Aktivität 57,57 mCi/mmol und Molekulargewicht 288,4 g wurden von NEN (New England Nuclear), Boston, USA bezogen. Die radiochemische Reinheit beider Substrate betrug laut Hersteller mehr als 99%, bestimmt mittels doppelter Papierchromatographie, Dünnschichtchromatographie und Rekristallisationsverfahren.
Da die radioaktiven Steroide nur in Benzol gelöst lieferbar waren, wurden sie zunächst vorsichtig eingedampft und danach in absolutem Äthanol p.a. gelöst, sodaß durch die Zugabe von 2o µl aktiver Äthanollösung Androstendion im Inkubationsansatz in der Konzentration von 2,5 µCi/ml Inkubationspuffer und Testosteron mit o,6 µCi/ml vorlag (siehe 3.2 Inkubation. Um die enzymatische Reaktion nicht zu beeinträchtigen, wurde die Menge des Lösungsmittels möglichst gering gehalten). Die gewählte Konzentration der Substrate, umgerechnet für ^{3}H-Δ-4 o,o55 nmol/ml Inkubationspuffer bzw. o,o83 nmol/g Hodenhomogenat und für ^{14}C-T 1o,4 nmol/ml bzw. 15,6 nmol/g, stützte sich auf frühere Arbeiten des Hormonlabors (26,32,45,49).

2.2 Nicht radioaktive Referenzsteroide

Androstendion (4-Androsten-3,17dion), Fa. Serva
Testosteron (17β-Hydroxyandrosten 4-on-3), Fa. Merck
5α-DHT (17β-Hydroxy-5α-androstanon-3), Fa. Merck
Androsteron (3α-Hydroxy-5α-androstanon-7), Fa. Merck
Androstandion (5α-Androstan-3,17-dion), Fa. Serva
Androstandiol (5α-Androstan-3α,17β-diol), Fa. Sigma

Sie wurden jeweils in der Konzentration 1 mg/ml in Äthanol gelöst.

2.3 Injektionsmedien

Den Kontrolltieren (N-Serie) wurde stets 1oo µl isotone o,9%-ige NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert.
Das synthetische Luteinisierende Hormon-Releasing Hormon, Relefact-LH-RH der Firma Hoechst/Frankfurt a. Main, entspricht dem natürlichen hypothalamischen Releasing Hormon und setzt in gleicher Weise LH und FSH aus der Hypophyse frei (57). Es wurde den Versuchstieren (L-Serie) in der Konzentration von o,4 µg/1oog Körpergewicht i.p. appliziert; dabei wurde Relefact-LH-RH je nach Körpergewicht der Ratten mit isotoner NaCl-Lösung verdünnt, sodaß das Injektionsvolumen stets um 1oo µl schwankte.
Das superaktive LH-RH-Analogon, das des-Gly^{1o}-(D-Ala^{6})-LH-RH-ethylamide der Firma Beckman, Genf, Schweiz soll in seiner stimulierenden Wirkung auf die Hypophyse 1o bis 3o mal so potent sein als das natürliche LH-RH (9,11,42,58,66). Es wurde daher in einer Versuchsreihe (S-Serie) den Ratten in der Konzentration von o,o4 µg/1oog Körpergewicht i.p. injiziert; in der anderen Versuchsreihe (SS-Serie) dagegen mit o,4 µg/1oog Körpergewicht i.p. eingespritzt. In beiden Reihen wurde das superaktive LH-RH mit isotoner NaCl-Lösung verdünnt, um ein Injektionsvolumen um 1oo µl zu erhalten.

2.4 Inkubationsmedium

Das Inkubationsmedium lehnt sich an die von Steinberger und Ficher (62) angewandte Methode. Es setzt sich zusammen aus:

1o ml Hank'scher Lösung (NaCl	8,oo g	
KCl	o,4o g	
$MgCl_2.6H_2O$	o,1o g	
$CaCl_2.2H_2O$	o,14 g	
$MgSO_4.7H_2O$	o,1o g	
$Na_2HPO_4.7H_2O$	o,o6 g	
KH_2PO_4	o,o6 g	
Glucose	1,oo g	
$NaHCO_3$	o,35 g	H_2O ad 1ooo ml)

1,75 ml NADP-Di-Na-Salz (MG 787,4) in der Konzentration 3,257 µmol/ml

1,75 ml Glucose-6-Phosphat-Di-Na-Salz (MG 3o4,1) in der Konzentration 36,17 µmol/ml

1,25 ml $NaHCO_3$, 1,3% in aqua dest.

Da der pH des Inkubationsmediums im alkalischen Bereich um 7,75 schwankte, wurde es mit o,1 n HCl auf den physiologischen pH von 7,4o titriert. Die isotone Hank'sche Lösung konnte von der Universitätsapotheke Tübingen fertig hergestellt und filtersterilisiert bezogen werden. Die Cofaktoren NADP und Glc-6-P stammten von Boehringer/Mannheim GmbH, das $NaHCO_3$ und die o,1 n HCl von Merck-AG/Darmstadt.

Das Verhältnis Hodengewebe/Inkubationslösung von 1ooo mg/1,5 ml wurde nach den Erfahrungen vorausgegangener Arbeiten des Labors (26,49) ebenso gewählt.

2.5 Chemikalien und wichtige Geräte

2.5.1 für den tierexperimentellen Teil

- Tuberkulinspritzen und feine Injektionsnadeln
- Tierwaage
- Dekapitationsschere
- Präparationsbesteck
- Kältemischung (Aceton und Trockeneis) im Thermobehälter zum sofortigen Einfrieren der entfernten Rattentestes
- Reagenzgläser, Trichter, Schnappdeckelgläschen

2.5.2 für den laborbiochemischen Teil

a) für die Inkubation:

- pH-Meter E 3oo (Metrohm Herisau/Schweiz)
- Potter-Homogenisator
- Wasserbad und Dubnoff-Shaker
- Carbogengas (95% O_2 / 5% CO_2), Begasungsvorrichtung
- Schliffgläschen mit Rundboden zur Inkubation

b) für die Extraktion:

- Zentrifuge, Schüttler, Rotationsmixer
- Wasserbad mit Luftbegasungsvorrichtung zum Eindampfen
- Tiefkühltruhe bis -8o°
- Schliffgläser mit Spitz, Trichter, Filterpapier
- Eppendorf- und Auslaufpipetten
- Essigsäure-äthyl-ester p.a. (Firma Merck)
- n-Hexan p.a. "
- Chloroform p.a. "
- 1-n-NaOH p.a. "

c) für die Dünnschichtchromatographie:

- Shandon-Schiene zur Herstellung der DC-Platten
- Kieselgel G Typ 6o (Firma Merck)
- Blaugel = Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator (Fa. Merck) zum Einlegen in die Glaskammern, welche zur Aufbewahrung der Platten dienen
- Propanolol-(2) (Fa. Merck)
- Molybdato-phosphorsäure (Fa. Merck)
- Spatel und blechernes Spezialschäufelchen (Eigenkonstruktion) zum Abkratzen der Gelschicht
- Fritten (spezielle Filtrationstrichter), Spitzgläser mit Schliff
- zur 1. Trennung:
  Glasplatten 2ox4o cm, große Trennkammer
  Laufmittel 1: Chloroform/Aceton/Essigsäureäthylester = 8/2/4, p.a. (Fa. Merck)
- zur Acetylierung:
  Pyridin und Essigsäureanhydrid p.a. (Fa. Merck)
- zur 2. Trennung:
  Glasplatten 2ox2o cm, kleine Trennkammer
  Laufmittel 2: Benzol/Essigsäureäthylester = 4/1, p.a. (Fa. Merck)

d) für die Messung der Radioaktivität:

- Dünnschichtscanner Lb 2723 (Zählgas: Methan) mit angeschlossenem Dual-Ratemeter-Integrator Lb 242 K und Schreiber Modell 232 (alles Fa. Berthold/Wildbad)

- Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Modell 2oo2
- Quickszint 5o1, Szintillator für nicht wässriges Probematerial (Fa. Zinser)
- Szintillationsröhrchen

e) für den Radioimmunassay zur Bestimmung von LH und FSH im Serum:

- Fa. Merck: Dinatriumhydrogenphosphat x $2H_2O$
  Natriumdihydrogenphosphat x $2H_2O$
  Natriumchlorid
  Kaliumjodid neutral
  Chloramin T (Trihydrat)
  Äthylenaminotetraessigsäure EDTA
  Bromphenolblau
  Natriumdisulfit
  Natriumazid
- Fa. Pharmacia/Freiburg: PD1o - Fertigsäule (Sephadex G 25)
- Wellcome Reagents Ltd., Beckenham, England:
  Rabbit Serum inactivated
  Precipitating Serum for Radioimmunassay (Donkey-Anti-Rabbit Gamma Globulin)
- Radiochemical Centre Amersham, London:
  Jod-125 (Na-Salz) IMS 3o
- Behringwerke:
  Rinderserumalbumin
- National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases (NIAMDD) rat pituitary hormone distribution program, Bethesda MD., USA:
  Purified Rat Luteinizing Hormone (NIAMDD-Anti-Rat LH-I-3)
  Antiserum to Rat luteinizing Hormone (NIAMDD-Rat LH Serum-1)
  Reference Preparation (NIAMDD-Rat LH-RP-1)
  Purified Rat Follicle Stimulating Hormone (NIAMDD-Rat FSH-I-1)
  Antiserum to Rat Follicle Stimulating Hormone (NIAMDD-Anti-Rat FSH Serum-6)
  Reference Preparation (NIAMDD-Rat FSH-RP-1)

- Assayröhrchen (Plastikreagenzgläschen zum Einmalgebrauch)
- Eppendorf- und Auslaufpipetten, Meß- und Erlenmeyerkolben
- Rota-Mix-Schüttler, Fa. Hock & Tucker
- Zentrifuge, Fa. Christ, Osterode/Harz, Typ UJ3 5
- Packard Auto-Gamma Scintillations-Spectrometer Nr. 516o

- Rezeptur für Lösung A, sog. "Diluent", der 1%-igen Rinderserumalbuminlösung in PBS-Azid (Phosphate buffer saline):

PBS-Azid:

66 ml o,1 M $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$
+434 ml o,1 M $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$
+5,8 g NaCl = o,1o M
+2oo mg Na-Azid = o,o2 %
ad 1ooo ml aqua dest = o,o5 M Phosphatpuffer
pH 7,4

Lösung A: "Diluent":
PBS-Azid
+ 1% Rinderserumalbumin

- Rezeptur für Lösung B, sog. "P3R" (Phosphate buffer plus 3% Rabbit-Serum):

PBS
+18,6 g EDTA
+3o ml Rabbit-Serum inactivated
+5oo mg Na-Azid
ad 1ooo ml aqua dest
pH 7,4

3. Versuchsdurchführung

Das Anlegen von Laufzetteln (s. Abb. 4 und 5), auf denen die einzelnen methodischen Schritte in Form einer Checkliste überprüft werden konnten, hatte sich in der Praxis bewährt.

Abb. 4: Laufzettel 1 (Tiere, Injektion, Inkubation, Extraktion)

Pool Nr. ..... Datum .....
Rattenalter ..... Tage
Injekt.-med.: NaCl ... LH-RH ... Super o,4 ... SSuper o,o4 ...

Ratte	I	II	III	IV
Gewicht				
Injektionsvol.				
Injektionszeit				
Tötungszeit				

Blut:
gesammelt um ..... Uhr, zentrifugiert um ..... Uhr
2oo µl jeweils abpipettiert für: LH ..... FSH .....
einschließlich der Reserveröhrchen eingefroren um ..... Uhr

Bemerkungen: .....

Testes:
eingefroren am ..... Pool Nr. .....
aufgetaut am ..... Uhr .....

Unter Eiskühlung homogenisieren, Homogenat: ..... mg
zugegebener "heißer" Puffer: ..... µl
Traceransatz siehe Protokollbuch S. .....

Inkubation von ..... bis ..... Uhr

1o ml EA und kalte Metabolite, schütteln ...
1o min schütteln bei 175 U/min ...
Zentrifugation, Überstand abpipettiert ...
5 ml warmer EA und kalte Metabolite ...
1o min schütteln bei 175 U/min ...
Zentrifugation, Überstand abpipettiert ...
Überstände vereinigt ind verdampft ...

1o ml 7o%-iges Methanol ...
1o ml n-Hexan ...
Zentrifugiert, Hexan verworfen ...
Methanolphase eingefroren ..... Uhr
in Tiefkühltruhe: filtriert ..... Uhr gespült ..... Uhr
Methanol eingedampft ...
1o ml Chloroform ...
mit 1 ml NaOH ausgewaschen: 1.Mal ... 2.Mal ...
Chloroform verdampft ...

am ..... aufgetragen auf Platte Nr. ..... Bahn ....

Abb. 5: Laufzettel 2 (DC-Platten, Recovery, Acetylierung)

Platte (4ox2o) Nr. ..... aufgetragen am .....

Bahn 1 Referenzengemisch ..... µl
2 Pool Nr. .....
3 " .....
4 " .....
5 " .....
6 Referenzengemisch ..... µl

Platte akklimatisiert ..... min (Kammersättigung?!)
Trennung von ..... bis ..... Uhr (LM-Front markiert?!)
Platte angefärbt ... im Trockenschrank entwickelt ...
Rf-Werte: 1 .... 2 .... 3,4 .... 5 .... 6 ....
Scannerdiagramm ...
Bereiche eingeteilt ... Besonderheiten .....

Bereiche abgekratzt am .....
Eluiert mit 2 x 2,5 ml EA: 1.Mal ..... 2.Mal .....
Eluate eingedampft ...

in 1 ml Äthanol gelöst am ..... davon 1oo µl ausgezählt am .....

Recovery:
Aktivität von 5o µl Puffer: K1 ..... c/1o'
K2 ..... c/1o'

Pool Nr.					
zugegebener Puffer (µl)					
≙ c/1o'	K1				
	K2				
Summe der ganzen Bahn (c/1o')	K1				
	K2				
Recovery (%)	K1				
	K2				

Acetylierung:
restliches Eluat Bereich 3,4 eingedampft, am ..... , ... Uhr
Referenzengemisch mitangesetzt und eingedampft ...
1oo µl ESA ..... und 1oo µl Pyridin ..... zugefügt
Ansatz geschüttelt ... und einen Tag stehengelassen ...
Ansatz eingedampft ..., ...Uhr

Platte (2ox2o) Nr. ..... aufgetragen am .....

Bahn 1 Referenzengemisch ..... µl
2 Pool Nr. .....
3 " .....
4 " .....
5 " .....
6 Referenzengemisch ..... µl

Platte akklimatisiert ..... min (Kammersättigung?!)
Trennung ..... bis ..... Uhr (LM-Front markiert?!)
Platte angefärbt ... im Trockenschrank entwickelt ...
Acetat - Rf-Werte: 1a .... 2a .... 3a .... 4a .... 5a ....
Scannerdiagramm ... Bereiche eingeteilt ... Besonderheiten.....
Bereiche abgekratzt am .....
Eluiert mit 2 x 2,5 ml EA: 1.Mal ... 2.Mal ... Eluate eingedampft ...

in 1 ml Äthanol gelöst ..... davon 1oo µl ausgezählt am .....

3.1 Tierexperimenteller Teil

Die Versuchstiere wurden immer morgens in der Zeit zwischen 6 und 9 Uhr behandelt.
Zunächst wurde das Tier gewogen und gekennzeichnet, daraufhin die entsprechende Menge des Injektionsmediums intraperitoneal appliziert, und danach wurde das Tier in seinen Käfig zurückgesetzt.
3o Minuten nach erfolgter Injektion - der Zeitspanne, die eine maximale Gonadotropinausschüttung bewirkt (24,33) - wurden die Ratten mit einer großen Schere dekapitiert und das dem Körper entströmende Blut sofort über einem Trichter aufgefangen. Anschließend wurde mit einem Bauchschnitt das Peritoneum eröffnet, kurz die Injektionsstelle überprüft und dann beide Hoden aus ihrer Lage herausgedrückt, anschließend der Nebenhoden und Samenstrang abpräpariert und die Hoden in ein Schnappdeckelgläschen überführt, das sofort in die Kältemischung aus Aceton und Trockeneis (ca -6o°C) gehängt wurde. Die Hoden der jüngeren Tiere wurden dabei gleich zum richtigen Pool zusammengefügt (vgl. III, 1. Versuchstiere).

Nachdem sämtliche Hoden des Tages auf diese Weise sofort tiefgefroren gesammelt waren, wurden sie bis zur weiteren Verarbeitung in der Tiefkühltruhe (-8o°C) aufbewahrt.

Das Blut wurde noch am Morgen zentrifugiert, vom Serum zweimal 2oo µl für den LH- und FSH-RIA in Assayröhrchen abpipettiert und tiefgekühlt im Gefrierschrank (-18°C) bis zur Gonadotropinbestimmung gelagert. Stets wurde dabei auch etwas Serum als Reserve miteingefroren.

3.2 Inkubation

Es hatte sich bewährt, den Versuchsgang folgendermaßen vorzubereiten: Als erstes wurden die für den Arbeitsgang vorgesehenen tiefgefrorenen Hoden bei Zimmertemperatur langsam aufgetaut; parallel dazu die notwendige Menge an Inkubationspuffer frisch angesetzt und auf den pH 7,4 eingestellt (s. 2.4 Inkubationsmedien).

Danach wurde das Inkubationsmedium "heiß" gemacht, d. h. aus der eingangs hergestellten radioaktiven Substratäthanollösung wurde pro ml Puffer 2o µl aktiver Testosteron- und 2o µl aktiver Androstendionlösung zugegeben, sodaß Testosteron in der Aktivität von o,6 µCi/ml (≙ 7.1ooooo c/1o') und Androstendion von 2,5 µCi/ml (≙ 15.oooooo c/1o') vorlag. Jeweils zwei Proben a 5o µl des nun radioaktiven Puffers wurden als Berechnungsgrundlage ausgezählt.

Nun wurde die Tunica vom aufgetauten Hoden abpräpariert und das Hodengewebe mit dem Homogenisator unter Eiskühlung schonend homogenisiert. Mit einer Eppendorf-Pipette wurde 1 ml Homogenat (ca 1o3o mg) in ein Inkubationsgläschen gegeben, die überführte Menge gewogen und hierauf die entsprechende Menge "heißes" Inkubationsmedium (Hodenhomogenat/Inkubationslösung ≙ 1ooo mg/1,5 ml) hinzugefügt und das Gemisch kräftig aufgeschüttelt.
Bei den 2o Tage alten Tieren wog die gepoolte und homogenisierte Hodengewebsmenge zwischen 55o und 78o mg (im Mittel 66o mg); dementsprechend wurde nach oben erwähntem Verhältnis das Inkubationsmedium hinzugefügt. Nach RIVAROLA et al. (52) ist die prozentuale Biokonversion des Testosterons bei verschieden großen Gewebsmengen gleich, solange das Verhältnis aller Komponenten des Inkubationsmediums konstant gehalten wird.
Das fertige Inkubationsgemisch wurde jetzt ins 37°C warme Wasserbad gestellt und unter vorsichtiger Carbonbegasung für 1 Stunde und unter behutsamem Schütteln mit dem Dutnoff-shaker inkubiert. Nach 6o Minuten, der üblichen Zeit in Biokonversionsstudien des Hormonlabors (26,27,45,49), wurden die Inkubationsgläschen wieder herausgenommen und die Inkubation durch Zugabe von 1o ml Essigsäureäthylester gestoppt.

3.3 Extraktion

Jetzt wurden je 2oo µl der sechs nicht radioaktiven Referenzsteroide (s. 2.2 Referenzsteroide: T, Δ-4, DHT, DION, DIOL, A-steron) als Carrier zugefügt und der Ansatz 1o Minuten lang

bei 2oo U/min in der Schüttelmaschine geschüttelt. Nach 5-minütiger Zentrifugation konnte der Überstand in ein neues Schliffgläschen überführt werden. Der Rückstand (wässrige Phase) wurde mit 5 ml warmem Essigsäureäthylester nochmals 1o Minuten bei 2oo U/min im Schüttler ausgewaschen und anschließend für 5 Minuten zentrifugiert. Beide Überstände wurden vereinigt und im Wasserbad bei 45°C vorsichtig eingedampft; die wässrige Phase wurde verworfen.

Der eingetrocknete Überstand wurde nun in 1o ml 7o%-igem Methanol gelöst, dazu wurden 1o ml n-Hexan gegeben und wieder für 1o Minuten bei 2oo U/min geschüttelt. Nach Zentrifugation von 5 Minuten wurde die obenstehende Hexanphase abgesaugt und weggeschüttet.
Nun mußte die Methanolphase für mindestens 12 Stunden in der Tiefkühltruhe (-8o°C) gelagert werden. Dadurch fielen die restlichen Lipide aus und konnten in der Tiefkühltruhe abgefiltert werden, wobei die Gläser und Filter mit 5 ml Essigsäureäthylester/Methanol (Mischungsverhältnis 2:1) nachgespült wurden (neue Gläser, Filter, Trichter, Spülflüssigkeit und Pipette waren ebenfalls tiefgekühlt). Das Filtrat wurde wieder im Wasserbad bei 45°C eingedampft und die Rückstände in 1o ml Chloroform gelöst.
Hierauf wurde die Lösung mit 1 ml 1n-NaOH auf dem Rotationsmixer heftig durchgeschüttelt, kurz zentrifugiert , der wässrige Überstand abgesaugt und weggeschüttet. Der Waschvorgang wurde ein zweites Mal mit ebenfalls 1 ml 1n-NaOH wiederholt. In der wässrigen Phase befanden sich die phenolischen Steroide (Östrogene), die auf diese Weise entfernt wurden. Die Chloroformphase wurde erneut bei 45°C eingedampft. Der nun verbleibende Rückstand war chromatographiefähig und wurde bis zur Trennung im Kühlraum aufbewahrt.

Immer wurden in jeder Altersgruppe drei Kontrollinkubationen und -extraktionen mit 1ooo ml "heißem" Inkubationsmedium ohne Gewebszusatz durchgeführt, um auch so die Methode zu überprüfen (s. 3.5 Validität der Methode).

3.4 Dünnschichtchromatographie

3.4.1 Große Dünnschichtchromatographie

Zur dünnschichtchromatographischen Trennung des Extrakts wurden 4o cm x 2o cm große Glasplatten verwendet. Sie wurden in die Shandon-Schiene eingespannt, mit Aceton abgerieben und dann mit einer Kieselgelsuspension o,3 mm dick beschichtet (7o g Kieselgel G Typ 6o in 14o ml Wasser aufgeschwemmt). Nach 1 Stunde Lufttrocknung wurden die Platten im Trockenschrank bei 8o°C für ca 4 Stunden weiter getrocknet und dann über hygroskopischem Blaugel aufbewahrt.

In die Kieselgelschicht der fertigen Platten wurden mit einem Holzstift durch einen selbstangefertigten Holzrost, der zur Strichführung diente, 4o cm lange und 2,5 cm breite Bahnen geritzt; dabei wurde streng darauf geachtet, daß die Ritzen gelfrei waren, die Bahnen exakt parallel liefen und die Startlinie 2,5 cm vom Plattenanfang eben sichtbar markiert war.

Auf die beiden äußeren Bahnen - Bahn 1 und Bahn 6 - wurden jeweils 15o µl des Referenzsteroidgemisches (bestehend aus den 6 Referenzsteroiden, jedes für sich gelöst in Äthanol 1 mg/1 ml und dann zum Gemisch vereint) bandenförmig auf die Startlinie aufgetragen.
Die radioaktiven Extrakte wurden unmittelbar vor dem Auftragen in 1oo µl Essigsäureäthylester gelöst und danach mit einer Eppendorfpipette auf die Startlinie der inneren Bahnen - Bahn 2 bis Bahn 5 - aufgebracht. Die Extraktgläschen wurden mit 5o µl Essigsäureäthylester nachgespült und der Inhalt vollständig aufpipettiert. Beim Auftragen mit der Pipette wurden möglichst schmale Banden (nicht breiter als 4 mm) gezogen und die Startlinie nach jeder aufgebrachten Bandenbreite trockengeföhnt. Die Platten wurden anschließend im Chromatographieraum (Raumtemperatur 25°C) für ca 3o minuten akklimatisiert.
Eine 6o x 6o x 2o cm (Länge x Höhe x Breite) große Trennkammer war bereits mit dem Laufmittel Chloroform/Aceton/Essigsäureäthylester = 18/2/4 ca 1 cm angefüllt und gesättigt; dazu war

die Kammer rundum mit Fließpapier ausgekleidet und unterhalb des Deckels entlang den Längsseiten waren Glasrinnen, die Laufmittel enthielten, befestigt.
Nach der Akklimatisation wurden die Platten nun 4,5 Stunden nahezu senkrecht stehend entwickelt. Das Laufmittel stieg so bis ca 1 cm unterhalb des Plattenendes hoch. Jetzt wurden die Platten entnommen und in waagrechter Lage luftgetrocknet.

Um die Referenzsteroide sichtbar zu machen, wurden die Innenbahnen abgedeckt und beide Außenbahnen mit 10%-iger Phosphormolybdänsäurelösung (1o g Molybdatophosphorsäure in Isopropanol ad 1oo ml) besprüht und in den Trockenschrank (45°C) für ca 3 Stunden gestellt; die einzelnen Referenzsteroide waren nun auf den Außenbahnen als dunkle Banden zu erkennen.

Als nächstes wurden die Platten unter den DC-Scanner gelegt und die radioaktiven Bahnen 2 bis 5 mit einer Geschwindigkeit von 3oo mm/h abgefahren und die jeweils vorhandene Radioaktivität durch den angeschlossenen Zweikanalschreiber mit derselben Geschwindigkeit aufgezeichnet.

Der Blendenspalt am Zählrohr maß o,5 mm x 2o mm und war offen, sodaß die Summe der Aktivitäten der ^{3}H- und ^{14}C-Strahlung aufgezeichnet wurde. Anfangs wurde eine zweite Scannung mit einer gleich großen Spezialblende durchgeführt, um nur die energiereichere ^{14}C-Strahlung zu registrieren. Somit lagen pro radioaktive Bahn zwei Diagramme vor. Da sich aber die Einteilungsgenauigkeit der Bereiche (s. u.) durch diesen Mehraufwand nicht erhöhte, wurde dann im Verlauf der Arbeit auf die zusätzliche Scannung mit der Spezialblende verzichtet.

Die einzelnen Scanneraufzeichnungen zeigten einen ähnlichen Kurvenverlauf; ein Beispiel ist in Abb. 6 wiedergegeben.

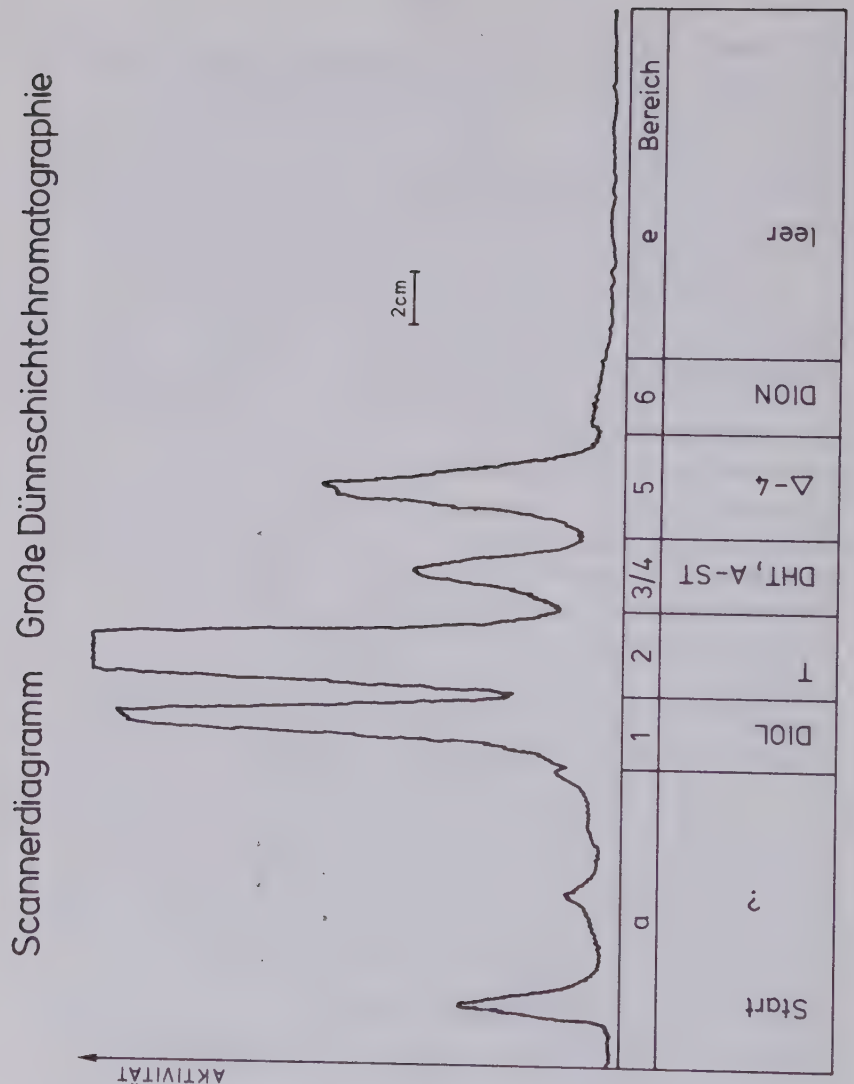


Abb. 6: Große Dünnschichtchromatographie, Darstellung der Aufzeichnung des Zweikanalschreibers
Als Musterbeispiel ist hier das Diagramm der Platte N 5o a, Bahn 2 abgebildet. Die Peaks geben die Intensität an wiedergefundener Radioaktivität einer Bahn wieder.
Die Einteilung der Bereiche ergab sich aus dem Diagramm und den mitgelaufenen Referenzsteroiden. Die Zuordnung der Bereiche zu den jeweiligen Steroiden erfolgte durch den Vergleich mit den chromatographierten Referenzsteroiden.

Zur Einteilung der Bereiche einer Bahn wurde zunächst die Scanneraufzeichnung millimetergenau eingeteilt und die Maße auf den Bahnrand punktförmig übertragen. Hierauf wurde die Aufzeichnung direkt neben die Platte gelegt und durch den direkten Vergleich mit den Referenzsteroiden, deren Rf-Werten und der punktförmigen Markierung die endgültige Einteilung der Bahn vorgrnommen (Rf-Werte s. 3.5.1 Sensitivität der Methode, Tab. 3).
Die Bereiche wurden nun scharf voneinander getrennt und das Gel einzeln von der Platte abgekratzt und mit einem eigens dafür gebastelten Schäufelchen in Filterglasröhrchen gegeben, um das Kieselgel mit zweimal 3 ml Essigsäureäthylester auszuwaschen.
Anschließend wurde der Essigsäureäthylester bei 45°C verdampft und das eingetrocknete Eluat in 1ooo µl Äthanol gelöst; davon zwei Proben mit je 5o µl in 1o ml Quickszint 5o1 überführt und dann im Packard Scintillation-Spectrometer ausgezählt.
Die restlichen 9oo µl des Bereichs 3,4 wurden für die Azetylierung erneut eingedampft und im Kühlraum bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Um gegebenenfalls eine Zählung wiederholen zu können, wurden die übrigen 9oo µl der anderen Bereiche noch solange aufbewahrt, bis ihr Zählergebnis bekannt war.

3.4.2 Azetylierung und kleine Dünnschichtchromatographie

Der eingedampfte Rückstand des Bereichs 3,4 wurde mit 1oo µl Pyridin und 1oo µl Essigsäureanhydrid versetzt, kräftig aufgeschüttelt und dann verschlossen für 24 Stunden bei Raumtemperatur unter dem Abzug stehengelassen. Als Vergleichssteroide wurden jeweils 1oo µl des in Äthanol gelösten (1 mg/1 ml) Referenzsteroidgemisches eingedampft und in gleicher Weise azetyliert. Danach wurden die Proben bei 45°C im Wasserbad eingedampft.
Für die nun folgende dünnschichtchromatographische Trennung wurden 2o x 2o cm große Glasplatten verwendet (Herstellung, Lagerung und Bahneinteilung analog den 4o x 2o cm Platten).

Die eingedampften Azetate wurden in 1oo µl Essigsäureäthylester gelöst und auf die Startlinie aufgetragen, die Gläschen mit jeweils 5o µl des gleichen Lösungsmittels nachgespült und die Spülung aufpipettiert. Auf die beiden Außenbahnen kamen wiederum die Referenzsteroide und auf die Innenbahnen die radioaktiven Proben (Auftrageprozedur gemäß den 4o x 4o cm Platten).
Nach halbstündiger Akklimatisation der Platten im Chromatographieraum wurden sie in einer gleichbleibend vorbereiteten Trennkammer (22 cm x 2o cm x 1ocm/Länge x Höhe x Breite, allseitig mit Fließpapier ausgekleidet) chromatographiert. Das Laufmittel war ein Gemisch aus Benzol : Essigsäureäthylester = 4 : 1, in das die Platten senkrecht stehend o,5 cm eingetaucht waren. Die Chroamtographiedauer betrug ca 5o Minuten; dadurch war das Laufmittel bis an den oberen Plattenrand gestiegen.
Das Sichtbarmachen der Referenzsteroide erfolgte ebenfalls durch Besprühen mit 1o%-iger Phosphormolybdänsäure und anschließender Trocknung bei 45°C im Heißluftschrank. Hierauf wurden die radioaktiven Bahnen wieder mit dem DC-Scanner mit der Geschwindigkeit von 3oo mm/h abgefahren und die Radioaktivitätsdichte mit dem Zweikanalschreiber aufgezeichnet. Um optimale Diagramme zu erhalten, mußte eine Platte oft mehrmals mit verschieden starker Empfindlichkeit gescannt werden.

Meistens wies der Kurvenverlauf der Bahnaufzeichnungen nur zwei Peaks auf, die des DHT- und A-steron-Azetats. Selten erschien noch ein dritter Peak, welcher als T-Azetat identifiziert werden konnte. In einigen Fällen zeigte sich noch als vierter Peak das Δ-4-Azetat (s. unten Abb. 7; Rf-Werte der Azetate s. 3.5.1 Sensitivität der Methode, Tab. 3).

Die Bereiche wurden nun analog dem Verfahren der großen Platten eingeteilt, scharf voneinander getrennt und das Gel in Filterglasröhrchen überführt und zweimal mit 3 ml Essigsäureäthylester ausgewaschen. Wiederum wurde das Lösungsmittel bei 45°C im Wasserbad verdampft und die Proben in 1ooo µl Äthanol gelöst. Davon wurden zwei Proben a 5o µl in 1o ml Quickszint 5o1

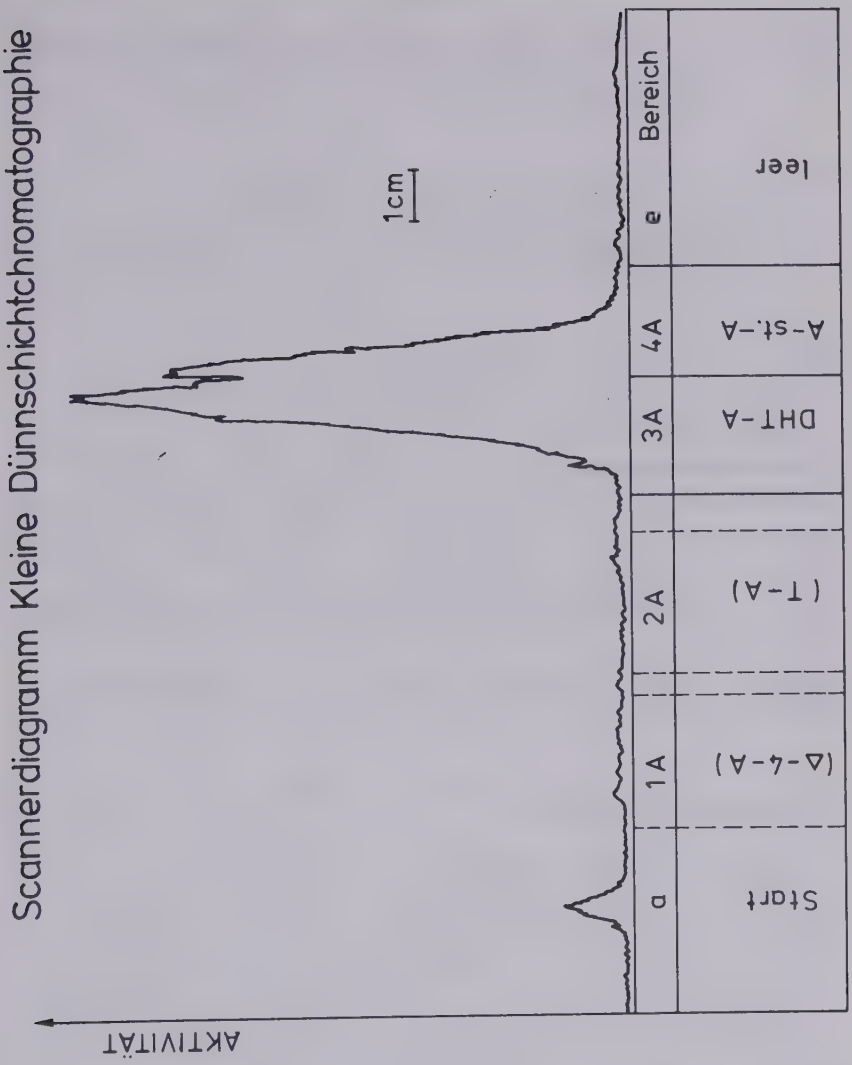


Abb. 7: Kleine Dünnschichtchromatographie, Aufzeichnung des Zweikanalschreibers

Dargestellt ist die Trennung der Azetate des Bereichs 3,4 der großen Dünnschichtchromatographie. Als Musterbeispiel sei hier das Diagramm der Platte L 35 d / 4 abgebildet.
Die Peaks geben die Radioaktivitätsdichte der Bahn wieder. Die Einteilung der Bereiche ergab sich aus den mitgelaufenen Referenzaztaten.
Die Zuordnung der Bereiche zum jeweiligen Steroidazeteat erfolgte durch den Vergleich mit den Referenzazetaten.
Gestrichelt ist der Bereich des T-Azetats und Δ-4-Azetats. In einigen Fällen zeigte sich an diesen Stellen ein dritter oder vierter Peak.

pipettiert und dann im Packard-Scintillation-Spectrometer ausgezählt.

3.5 Einstellung des Scintillation-Spectrometers

Die Einstellung des Zählers ergab sich aus der Zählung eines ^{3}H- und ^{14}C-Standards und den daraus resultierenden Meßkurven. So wurde am Spectrometer für die ^{3}H-Aktivitätsmessung (Kanal 1) die "window"-Breite von 5o - 225 und das "gain" von 5o% gewählt; für die ^{14}C-Aktivitätsmessung (Kanal 2) lagen die "window"-Grenzen bei 225 - 1ooo und das "gain" bei 9%.

Dadurch wurde die ^{3}H-Aktivität ausschließlich in Kanal 1 registriert und die gleichzeitig miterfaßten counts in Kanal 2 lagen in der Größenordnung der "Background"-Strahlung. Dagegen wurde in der von Kanal 2 ausgezählten ^{14}C-Aktivität noch 1o,4% $\pm$ o,4% in Kanal 1 mitgemessen.
Die ^{3}H-Aktivität eines jeden Bereichs (sprich Steroid) ergab sich deshalb aus der Subtraktion der "eingestreuten" ^{14}C-Aktivität (1o,4% der counts des Kanal 2) von den counts in Kanal 1.

3.6 Validität der Methode

3.6.1 Sensitivität der Methode

a) In jeder Altersstufe wurde dreimal eine Inkubation und Extraktion von ^{3}H-Androstendion und ^{14}C-Testosteron ohne Gewebszusatz und anschließender Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Dabei fand man im Scannerdiagramm der großen Dünnschichtchromatographie nur zwei Peaks, immer genau dort, wo T und Δ-4 lokalisiert waren. Die in diesen Peaks wiedergefundene Radioaktivität lag bei ^{14}C-T im Mittel bei 97,o5% und bei ^{3}H-Δ-4 im Mittel bei 91,62% (Gesamtradioaktivität der Bahn = 1oo% gesetzt, s. Tab. 2).
Aus der Verteilung der Radioaktivität darf man also folgern, daß eine spontane Umwandlung der Substrate in andere Steroide nicht stattgefunden hat.

Tab. 2: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität bei Inkubation von ^{14}C-T und ^{3}H-Δ-4 ohne Gewebszusatz.
Angaben in %, Probenzahl: n = 12, Bereiche: s. Abb. 3

	Bereich:							
	a	1	2(T)	3	4	5(Δ-4)	6	e
^{14}C-T	1,93	o,o1	97,o5	o,o2	o,o3	o,69	o,24	o,o3
^{3}H-Δ-4	5,o6	o,39	1,37	o,o3	o,o6	91,62	1,o3	o,44

b) Nach den Erfahrungen vorausgegangener Arbeiten des Hormonlabors (26,49) wurde die Radioaktivität der einzelnen Bereiche den jeweiligen Steroiden so zugeordnet, wie es die Trennung der bekannten Steroide anzeigte (s. unten Tab. 3). Auf eine Identifizierung jeder wiedergefundenen radioaktiven Substanz, z. B. mittels Rekristallisation und Bestimmung der spezifischen Radioaktivität, wurde aufgrund des großen methodischen Aufwands verzichtet.

Tab. 3: Rf-Werte der Referenzsteroide und Referenzazetate; aufgeführt ist das arithmetische Mittel ($\bar{x}$) und die Standardabweichung (s), n = 14.

	Bereich	Steroid	$\bar{x}$	s
große DC:	1	DIOL	o,25	o,o1
	2	T	o,31	o,o1
	3/4	DHT/A-steron	o,39	o,o2
	5	Δ-4	o,47	o,o2
	6	DION	o,56	o,o2
kleine DC:	1A	Δ-4-Azetat	o,24	o,o2
	2A	T-Azetat	o,41	o,o2
	3A	DHT-Azetat	o,56	o,o2
	4A	A-steron-Azetat	o,61	o,o2
	5A	DIOL-Azetat	o,7o	o,o2

c) Wie aus der Ergebnisberechnung (s. IV 3.1) hervorgeht, wurde die wiedergefundene Radioaktivität einer Bahn gleich 1oo% gesetzt. Diese Berechnung setzt voraus, daß alle Steroide im gleichen Maße Verluste erleiden. Die Durchsicht der Arbeiten mit gleicher oder ähnlicher Methode zeigt, daß die meisten Autoren (15,16,35,36,51,52,6o,62) vor der Extraktion anders markierte Tracer-Steroide hinzufügen, um die Verluste eines jeden Steroids einzeln zu korrigieren.

3.6.2 Präzision der Methode

Es wurde streng darauf geachtet, daß die äußeren Bedingungen (z. B.: Einhalten der selben Tageszeit beim tierexperimentellen Teil, Verwendung stets der gleichen Pipetten und Apparate, Entnahme der Reagenzien stets aus den gleichen Gefäßen) konstant gehalten wurden. Die einzige Variation der Versuchsbedingungen mußte bei den 2o Tage alten Ratten aufgrund der geringen Hodengewebsmenge vorgenommen werden: das inkubierte Hodenhomogenat wog bei den 2o Tage alten Ratten im Mittel 66o mg (im entsprechenden Verhältnis wurde die zugegebene Puffermenge variiert); bei allen anderen Altersstufen wog es 1ooo mg (s. 3.2 Inkubation)
Jede Bestimmung wurde in jeder Altersstufe und für jede Behandlungsart sechsmal durchgeführt. Von den insgesamt 96 Versuchsansätzen verunglückten drei Proben. Die Fallzahl der Versuchsdurchführungen für jeden angegebenen Mittelwert beträgt also n = 6, mit drei Ausnahmen (hier n = 5, s. Tab. 7, 9 und 1o: Zahl der Versuchsansätze). Als zuverläßiges Maß für die Präzision der Bestimmungen gilt die Standardabweichung. Sie kann den Tabellen 7 bis 1o entnommen werden.

3.6.3 Recovery

Die Gesamtradioaktivität einer Bahn betrug bei der ^{3}H-Zählung im Mittel 59,52% (Extremwerte 75,35% und 41,8o%) der als

^{3}H-Androstendion zugegebenen Ausgangsaktivität; bei der ^{14}C-Zählung fanden sich im Mittel 55,o5% (Extremwerte 74,99% und 3o,2o%) der Ausgangsaktivität des ^{14}C-Testosterons wieder.

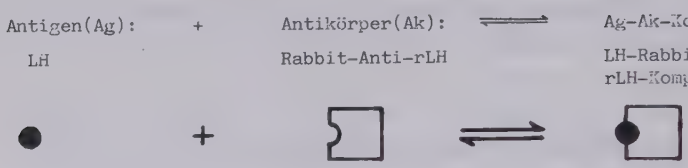
3.7 Radioimmunassay (RIA) zur Bestimmung von LH und FSH

3.7.1 Prinzip des Radioimmunassay

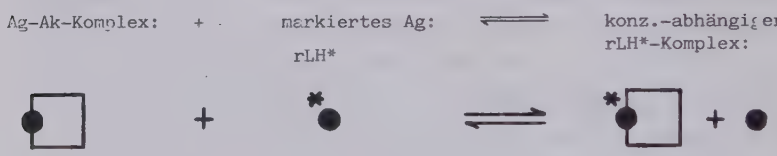
Derzeit besitzt der Radioimmunassay (14,41) in der laborchemischen Diagnostik einen nicht mehr hinwegzudenkenden Platz infolge der großen Nachweisempfindlichkeit und Nachweisspezifität in der Bestimmung von Proteo- und Steroidhormonen, Immunglobulinen, Arznei- und Giftstoffen.

Bei der radioimmunologischen Bestimmung reagieren unbekannte nicht radioaktive Antigenmengen und bekannte radioaktiv-markierte Antigenmengen mit einer konstanten Menge eines Antikörpers. Während der Inkubation bildet sich ein Antigen-Antikörper-Komplex, bei dem das unbekannte Antigen mit dem radioaktiv-markierten um die Bindungsstellen des spezifischen Antikörpers konkurriert. So nimmt die Radioaktivität des Antigen-Antikörper-Komplexes in dem Maße ab, in dem die Konzentration des unbekannten nicht radioaktiven Antigens in der Probe zunimmt. Eine Trennung des antikörpergebundenen Antigens von freiem Antigen kann man dadurch erreichen, daß man zu dem Antigen-Antikörper-Komplex einen zweiten Antikörper hinzufügt, der diesen Komplex ausfällen läßt (sog. Doppel-Antikörper-Methode), oder daß man das freie Antigen an z. B. Aktivkohle oder Kunstharz adsorbiert (sog. Adsorptionsverfahren). Mittels Eichkurven (sog. Standardkurven), die durch Parallelansätze mit definierten Mengen von Antigen und Antikörper in einer Verdünnungsreihe gewonnen werden, läßt sich die effektive Konzentration des Antigens ablesen.
Dem im Experiment angewandten Radioimmunassay liegt die Doppel-Antikörper-Methode zugrunde. Schematisch lassen sich die einzelnen Schritte des Verfahrens wie folgt darstellen (als Beispiel dient LH):

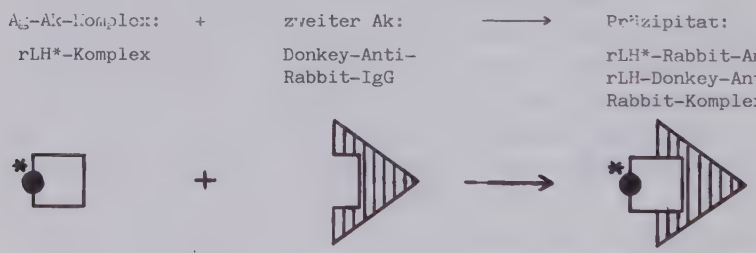
a) Antigen-Antikörper-Reaktion:



b) Konkurrenz der Antigene um die Bindungsstellen am Antikörper:



c) Trennung mit Hilfe des zweiten Antikörpers:



3.7.2 Durchführung des RIA

Die Durchführung der radioimmunologischen Bestimmung von rLH und rFSH (r = rat) orientierte sich an den Anweisungen des National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases (NIAMDD) Rat Pituitary Hormone Distributation Program, Bethesda MD, USA. Der RIA konnte im Rahmen eines Forschungsprogramms von Dipl. Biochemiker Dr. med. W. Blum im Endochrinologischen Labor der Kinderklinik mitdurchgeführt werden.

Das Testbesteck des NIAMDD enthielt die Referenzpräparation (rLH-RP-1 bzw. rFSH-RP-1), den spezifischen Antikörper (Rabbit-Anti-rLH bzw. Rabbit-Anti-rFSH) und das gereinigte Gonadotropin (rLH-I-1 bzw. rFSH-I-1), welches mit der Chloramin-T-Methode (s. unten) mit J^{125} radioaktiv markiert wurde. Der zweite Antikörper (Donkey-Anti-Rabbit-IgG) stammte von den Wellcome Laboratories. Sämtliche Lösungen (A bis E) wurden am Tage des Gebrauchs hergestellt und die Volumina unter Berücksichtigung der Probenzahl berechnet.

Die fertigen Lösungen A, B und E wurden vor der Anwendung durch einen Millipore-Filter Typ AH o,45 µm filtriert. Die Rezepturen für die einzelnen Lösungen finden sich in der Auflistung: 2.5.2 Materialien für den laborchemischen Teil.

Die Proben für die Erstellung der Standardkurven wurden dreifach und die für die rLH- und rFSH-Messung doppelt angesetzt. Außerdem wurden noch drei Proben nur mit Lösung A (Diluent) für die Bestimmung der sog. B_o-Bindung hergerichtet. Die Werte der B_o-Bindung geben den Ausgangspunkt der Standardkurve wieder, also den Bezugspunkt, bei dem die Standardhormonkonzentration gleich Null ist.

Die Reagenzien:

Lösung A: "Diluent": 1% Rinderserumalbumin in PBS-azid

B: "P3R": 3% Kaninchenserum in Phosphatpufffer

C: "1. Antikörper": Rabbit-Anti-rLH in P3R 1 : 1oooo verdünnt, bzw. Rabbit-Anti-rFSH in P3R 1 : 25oo verdünnt

D: "Tracer": Jodiertes reines rLH bzw. rFSH in Diluent so gelöst, daß die Aktivität in 1oo µl ca 1oooo cpm beträgt

E: "2. Antikörper": Donkey-Anti-Rabbit-IgG in Diluent 1 : 12 verdünnt

Nacheinander wurden folgende Schritte ausgeführt:

a) Alle im tierexperimentellen Teil gewonnenen und in der Tiefkühltruhe gelagerten Seren, jeweils schon zu 2oo µl ins Glasröhrchen abpipettiert, wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut.

b) Währenddessen wurden für die Standardkurven 1oo µl der mit Diluent verdünnten Referenzpräparationen in einer Verdünnungsreihe von 2,5 ng bis 5oo ng rLH/1oo µl bzw. 2,5 ng bis 5oo ng rFSH/1oo µl in das RIA-Röhrchen pipettiert. Hinzu kamen noch die drei Proben mit je 1oo µl Diluent für die Messung der B_o-Bindung.

c) Nun wurden alle angesetzten Röhrchen mit Diluent auf das identische Volumen von 3oo µl aufgefüllt.

d) Hierauf wurden in jedes Röhrchen 2oo µl des 1. Antikörpers (Lösung C) pipettiert; die entstehende Mischung kurz auf einem Rota-Mix-Schüttler aufgeschüttelt und dann über 24 Stunden im Kühlraum inkubiert.

e) Danach wurden 2oo µl Tracer (Lösung D) hinzugegeben; wiederum wurde das Gemisch kurz aufgeschüttelt und für weitere 24 Stunden im Kühlraum inkubiert.

f) Jetzt konnten 2oo µl des 2. Antikörpers (Lösung E) zugegeben werden. Nach Aufschütteln folgte eine Inkubation im Kühlraum über 72 Stunden nach.

g) Abschließend wurde zunächst das Inkubationsgemisch über 3o Minuten bei 2ooo g zentrifugiert, dann der Überstand abgesaugt und verworfen. Danach wurde das Präzipitat in 1 ml PBS-azid mit dem Rota-Mix aufgeschüttelt und nochmals über 2o Minuten bei 2ooo g zentrifugiert; der Überstand wurde gleichfalls abgesaugt und verworfen.

h) Das nun vorliegende Präzipitat wurde 3 Minuten im Gamma-Szintillations-Spectrometer gezählt.

Aus den Ergebnissen der Referenzpräparation wurde die Standardkurve erstellt, an Hand derer die Werte der unbekannten Proben ermittelt werden konnten. Die Ergebnisse werden als ng NIAMDD-rLH-RP-1 bzw. als ng NIAMDD-rFSH-RP-1 pro ml Serum ausgedrückt.

3.7.3 Jodierung von rLH und rFSH nach der Chloramin-T-Methode

Das mit $^{125}I^-$ radioaktiv-markierte rLH bzw. rFSH wurde freundlicherweise von Hr. Blum schon in der benötigten Aktivität von 1oooo cpm/1oo µl Diluent (s. Lösung D) zur Verfügung gestellt.
Für die Jodierung galten die Richtlinien der Chloramin-T-Methode nach Hunter und Greenwood (2o). Das Prinzip der Methode besteht darin, mit Hilfe des Oxidationsmittels Chloramin T $^{125}I^-$ zu $^{125}I^o$ zu oxidieren; das so aktivierte $^{125}I^o$ bindet sich dann an aromatische Ringe im Hormonmolekül. Nach kurzer Reaktionszeit (1 Minute) wird die Reaktion durch Zugabe des Reduktionsmittels Natriumdisulfit gestoppt. Anschließend muß das markierte Hormon von noch freiem $^{125}J^-$ und radioaktiven Spaltprodukten getrennt werden. Diese Trennung erfolgte über eine Sephadex G 25 Säule.

Im einzelnen wurden nacheinander pipettiert:

1) 2 µg reines rLH bzw. rFSH, gelöst in 2o µl PBS
2) 2o µg des o,5 M Phosphat Puffers, pH 7,4
3) 5 µl Na-$^{125}I^-$, entsprechend o,5 mCi $^{125}I^-$
4) 1o µl o,25%-ige Chloramin-T-Lösung in aqua dest, dadurch Start der Reaktion
5) Nach 6o sec Stoppen der Jodierung mit 3o µl o,25%-iger Natriumdisulfitlösung in aqua dest
6) 1oo µl Transferlösung, bestehend aus 2% Rinderserumalbumin in PBS-azid plus 1% Kaliumjodid plus einer Spatelspitze Bromphenolblau (dient dazu, die Proteinfraktion bei der Säulentrennung wandern zu sehen).

Die Fraktionen wurden im Gamma-Zähler ausgezählt und die Ergebnisse in einer sog. Elutionskurve dargestellt. Es fanden sich dabei zwei Peaks. Der erste Peak entsprach der gemessenen Radioaktivität des markierten rLH bzw. rFSH. Der zweite Peak wiederspiegelte die Radioaktivität von nicht umgesetztem $^{125}I^-$.

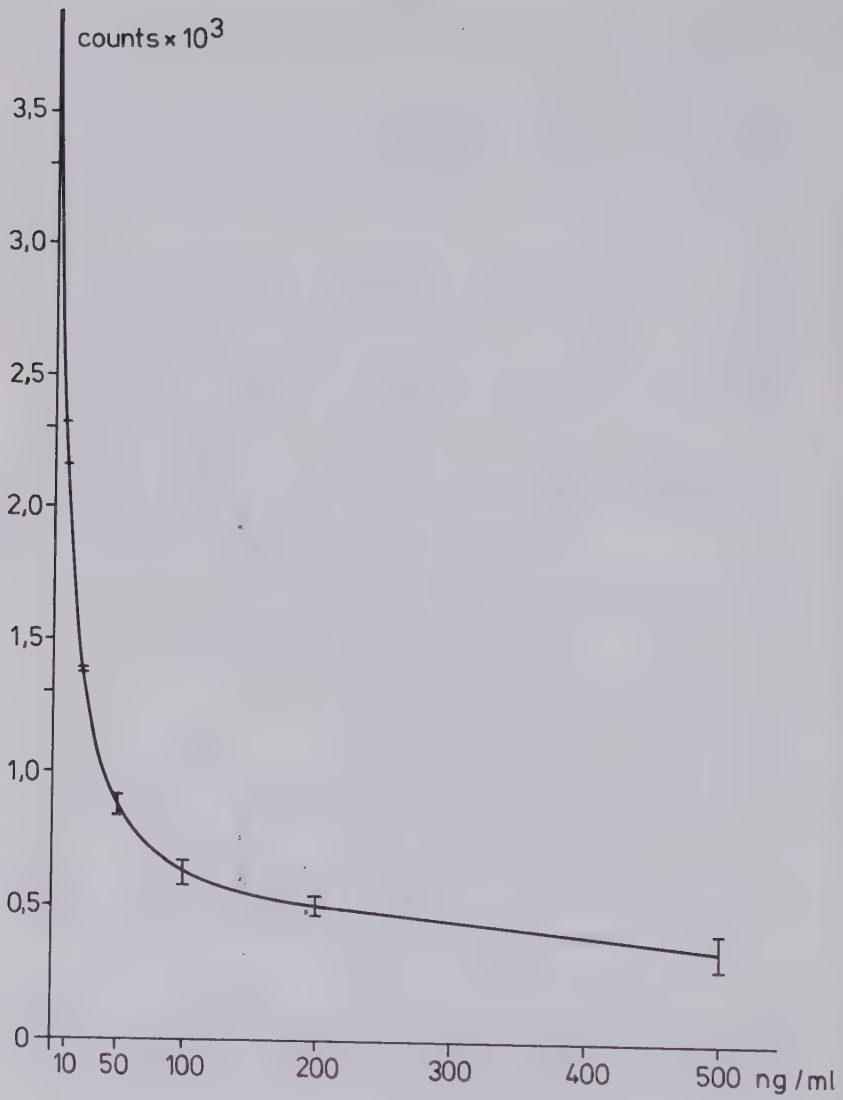


Abb. 8: Standardkurve für rLH
Dargestellt ist die Verdünnungsreihe der NIAMDD-rLH-RP-1 in ng/ml zur korrespondierenden Radioaktivität in counts/3 min.

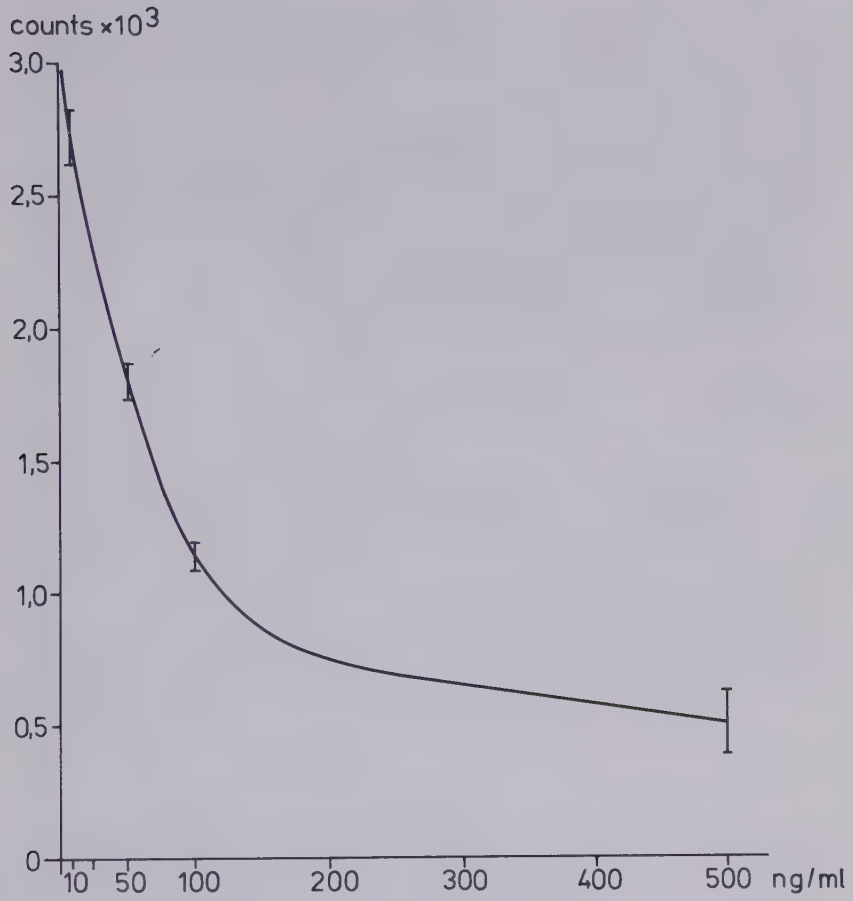


Abb. 9: Standardkurve für rFSH
Dargestellt ist die Verdünnungsreihe der NIAMDD-rFSH-RP-1 in ng/ml zur korrespondierenden Radioaktivität in counts/3 min.

3.7.4 Inter- und Intraassay Variation

Jeder Gonadotropin-Wert wurde zweifach bestimmt. Sowohl für die LH- als auch FSH-Bestimmung wurde nur je ein Assay angewandt. Eine Bestimmung der Interassay Variation = Variation der Hormonkonzentration in verschiedenen Assays erübrigte sich daher.

Die Intraassay Variation bezeichnet die Variation der Ergebnisse bei der Mehrfachbestimmung der Hormonkonzentration innerhalb des gleichen Assays. Sie schwankte im Experiment zwischen 5% und 1o%, vergleichbar mit anderen LH- und FSH-Bestimmungen des Hormonlabors (23,24,39).

IV ERGEBNISSE

1. Statistische Datenauswertung

Als statistisches Verfahren der Wahl wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (gekreuzter Versuchsplan) durchgeführt; der multiple t-Test war wegen der Nichtorthogonalität zahlreicher Vergleiche nicht geeignet. Die 16 Zellen des Versuchsplans (4 Stufen für Alter, 4 Stufen für Behandlung) waren mit drei Ausnahmen (n = 5) mit n = 6 Versuchsansätzen besetzt.

Die erste Voraussetzung für die Durchführung der Varianzanalyse - Normalverteilung wurde mit einem von SACHS angegebenen Schnelltest überprüft, dabei ergab sich, daß diese in so gut wie allen Fällen erfüllt war; die zweite Voraussetzung - Varianzhomogenität ließ sich in der Mehrzahl der Fälle mit dem BARTLETT-Test sichern.
Zum Vergleich der einzelnen Zellen wurde der SCHEFFE-Test, ein nichtorthogonales, aposteriorisches Verfahren eingesetzt; dies bedeutet, daß damit erhaltene Signifikanzen nur bei einem signifikanten F der Haupteffekte relevant sind.

Die statistische Datenverrechnung wurde von Hr. Dipl. Biochemiker B. Blank, einem Mitarbeiter des Hormonlabors, am Zentrum für Datenverarbeitung der Universität Tübingen vorgenommen.

1.1 Angeführte statistische Größen

n = Anzahl der Versuchsansätze/Bestimmungen

$\bar{x}$ = arithmetischer Mittelwert: $\bar{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i$

s = Standardabweichung: $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$

$s_{\bar{x}}$ = mittlerer Fehler des Mittelwertes: $s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$

F bzw. p = Signifikanzniveau; bezeichnet die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Signifikanz des Unterschieds zweier zu vergleichender Mittelwerte.
Bedingung: $p < 0{,}05$

2. Ergebnisse der Serumgonadotropine

Die im Text und in den Abbildungen aufgeführten Konzentrationen von FSH und LH sind allesamt arithmetische Mittelwerte aus jeweils 6 Bestimmungen.

2.1 Ergebnisse der FSH-Serumspiegel

Die zweifaktorielle Varianzanalyse wies sowohl für das Alter als auch für die Behandlungsart ein hochsignifikantes p (o,oo1) der Haupteffekte auf, und der SCHEFFE-Test konnte zur Prüfung der Signifikanz der Zeilen- und Spalteneffekte (s. nachfolgende Tab.) angewandt werden.

Tab. 4: Ergebnisse der FSH-Serumspiegel (ng/ml) 3o Minuten nach Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = superaktives LH-RH o,o4 µg/1oog KG und SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG.

Aufgeführt ist das arithmetische Mittel aus jeweils 6 Bestimmungen, nach Altersstufe (Zeilen) in Abhängigkeit der Behandlungsart (Spalten) gruppiert. In Klammern ist die Standardabweichung wiedergegeben.
Für statistische Zwecke gibt die rechte Außenspalte das Zeilenmittel und in Klammern dessen Abweichen vom Gesamtmittel an; die unterste Zeile nennt die Spaltenmittel und deren Abweichen vom Gesamtmittel.

	Behandlungsart: N	L	S	SS	Zeilenmittel=ZM (ZM - GM)
Rattenalter: 2o d	5,83	165,83	21o,83	3oo,oo	17o,63
	(4,92)	(4o,42)	(96,3o)	(35,o7)	(-121,93)
35 d	366,oo	475,oo	595,oo	69o,oo	536,14
	(67,12)	(59,41)	(19o,2)	(123,7)	(243,58)
5o d	223,33	363,33	335,oo	319,17	31o,21
	(26,2o)	(59,55)	(48,37)	(94,1o)	(17,66)
9o d	1o5,83	195,oo	236,67	156,67	173,54
	(33,83)	(36,47)	(36,7o)	(48,75)	(-119,o1)
Spaltenmittel=SM	166,96	299,79	333,48	366,46	292,55
(SM - GM)	(-125,6o)	(7,24)	(4o,93)	(73,91)	Gesamtmittel=GM

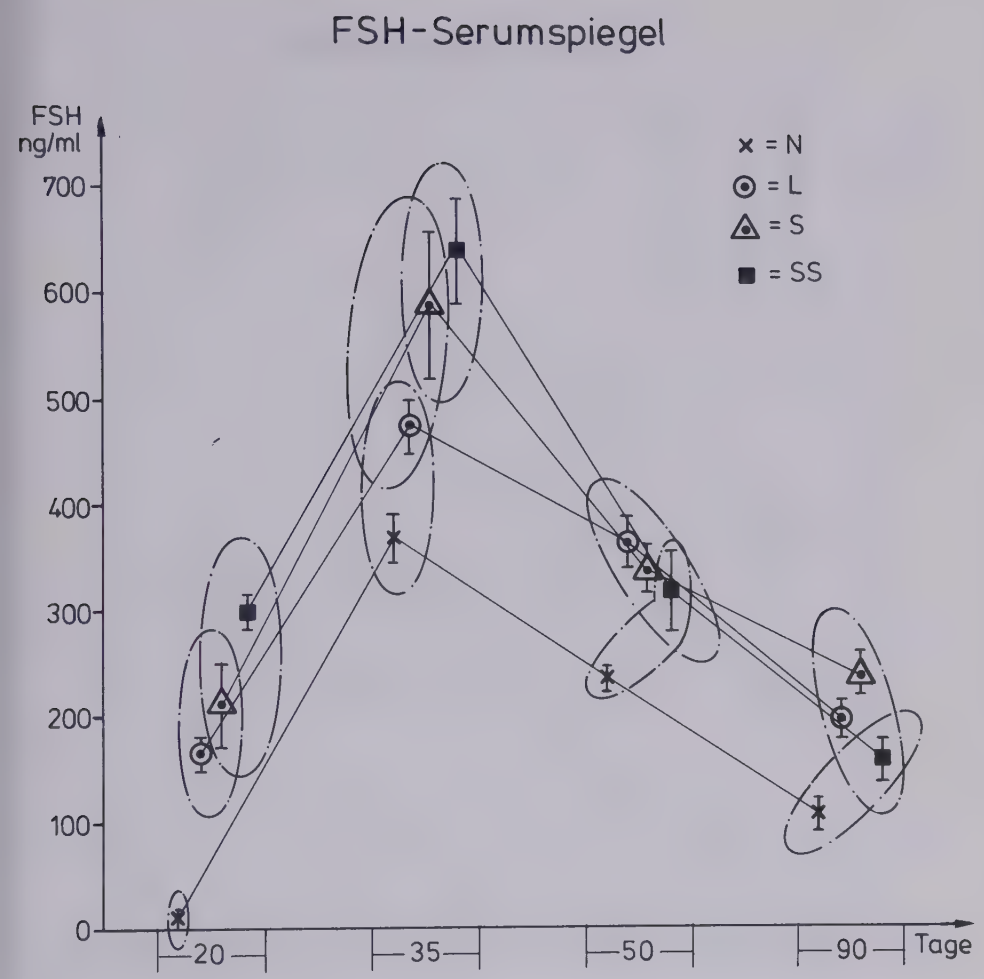


Abb. 1o: FSH-Serumwerte in ng/ml in den verschiedenen Altersgruppen 3o min nach i.p.-Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = superaktives LH-RH o,o4 µg/1oog KG, SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG.
Die senkrechten Striche geben $s_{\bar{x}}$ an. Oval eingerahmte Werte unterscheiden sich nicht statistisch signifikant. Die ovaläre Einrahmung ist willkürlich gewählt.
Als Interpretationsbeispiel sei das Ergebnis der 2o Tage alten Ratten erläutert: der N-Wert ist signifikant unterschiedlich vom L-, S- als auch SS-Wert; der L- und S-Wert unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, ebenso wenig der S- und der SS-Wert; jedoch weist der L-Wert gegenüber dem SS-Wert einen signifikanten Unterschied auf.

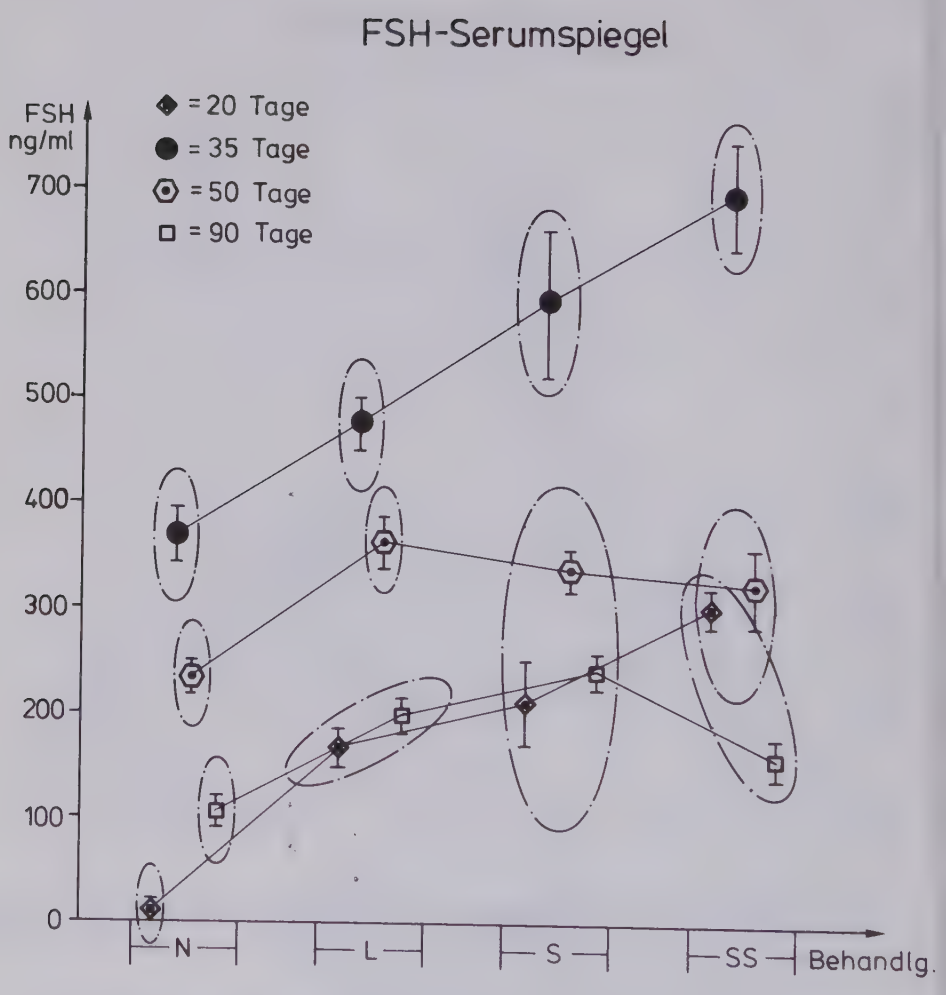


Abb. 11: FSH-Werte nach Behandlungsart gruppiert, Darstellung des Alters-stufeneffekts
Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = super-aktives LH-RH o,o4 µg/1oog KG, SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG.
Die senkrechten Striche geben $s_{\bar{x}}$ an. Oval eingerahmte Werte unter-scheiden sich nicht statistisch signifikant voneinander. Die ovaläre Einrahmung ist willkürlich gewählt (vgl. Interpretations-beispiel der Abb. 1o).

Betrachtet man zunächst einmal die Ergebnisse der Kontrollgruppe (N), so findet sich der normale altersabhängige Verlauf der FSH-Konzentration im Serum: den niedrigsten Wert bei den jüngsten Tieren, die höchste Konzentration bei den pubertierenden Ratten, ein Absinken der Werte hin zum Erwachsenenalter (alle Werte statistisch signifikant verschieden).
Durch die LH-RH-Stimulation (L) steigt signifikant der FSH-Spiegel in allen Altersstufen. Den gleichen Efffekt bewirkt die Stimulation mit superaktiven LH-RH o,o4 µg/1oog KG (S), wobei die gefundenen L- und S-Werte sich in keiner Altersstufe statistisch signifikant voneinander unterscheiden.

Eine weitere Steigerung der FSH-Konzentration kann durch die Gabe von superaktivem LH-RH o,4 µg/1oog KG (SS) nur bei den 2o und 35 Tage alten Ratten erzielt werden; diese Steigerung ist gegenüber den L-Werten statistisch signifikant höher. Dagegen zeigen die 5o und 9o Tage alten Tiere durch die SS-Behandlung, verglichen mit den L- und S-Werten, etwas niedrigere Werte; allerdings haben die L-, S- und SS-Werte bei den 5o und 9o Tage alten Ratten die gleiche statistische Signifikanz.

2.2 Ergebnisse der LH-Serumspiegel

Auch für die LH-Werte zeigt die Varianzanalyse der Haupteffekte (Alter, Behandlungsart) ein hochsignifikantes p (o,oo1). Zum Vergleich der Mittelwerte wird der SCHEFFE-Test herangezogen (s. unten Tab. 5 sowie Abb. 12 und 13).

Tab. 5: Ergebnisse der LH-Serumspiegel (ng/ml) 3o Minuten nach Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = superaktives LH-RH o,o4 µg/1oog KG und SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG.

Aufgeführt ist das arithmetische Mittel aus jeweils 6 Bestimmungen, nach Altersstufe (Zeilen) in Abhängigkeit der Behandlungsart (Spalten) gruppiert. In Klammern ist die Standardabweichung wiedergegeben.
Für statistische Zwecke gibt die rechte Außenspalte das Zeilenmittel und in Klammern dessen Abweichen vom Gesamtmittel an; die unterste Zeile nennt die Spaltenmittel und deren Abweichen vom Gesamtmittel.

	Behandlungsart: N	L	S	SS	Zeilenmittel=ZM (ZM - GM)
Rattenalter: 2o d	11,67	136,67	135,83	39o,83	168,75
	(9,31)	(23,38)	(36,8o)	(226,5)	(-4,6o)
35 d	27,oo	223,33	234,oo	35o,oo	215,68
	(1o,37)	(72,43)	(85,76)	(115,6)	(42,33)
5o d	29,17	237,5o	195,oo	393,33	213,75
	(18,55)	(35,46)	(37,28)	(2o9,3)	(41,46)
9o d	38,33	115,93	136,67	1o4,17	98,75
	(13,66)	(38,78)	(32,81)	(56,78)	(-74,6o)
Spaltenmittel = SM	26,52	178,33	172,83	3o9,58	173,35
(SM - GM)	(-146,83)	(4,98)	(-o,52)	(136,23)	Gesamtmittel=GM

Die LH-Serumwerte zeigen, im Gegensatz zu den FSH-Werten, keinen altersabhängigen Gipfel. In der Kontrollgruppe (N) nimmt die LH-Konzentration von den jüngsten Tieren hin zu den erwachsenen Tieren stets etwas zu. Durch die LH-RH-Stimulation (L) steigen die LH-Werte erwartungsgemäß stark an, statistisch signifikant bei den 35, 5o und 9o Tage alten Ratten. Den fast identischen Anstieg erzeugt die Gabe von superaktivem LH-RH o,o4 µg/1oog KG (S).
Die höchsten LH-Serumkonzentrationen kommen durch die Injektion des superaktiven LH-RH o,4 µg/1oog KG (SS) zustande, in statistisch signifikantem Maße allerdings nur bei den 2o Tage alten Tieren. Bei den 35 und 5o Tage alten Ratten liegen die SS-Werte zwar deutlich über den L- und S-Werten, jedoch ohne

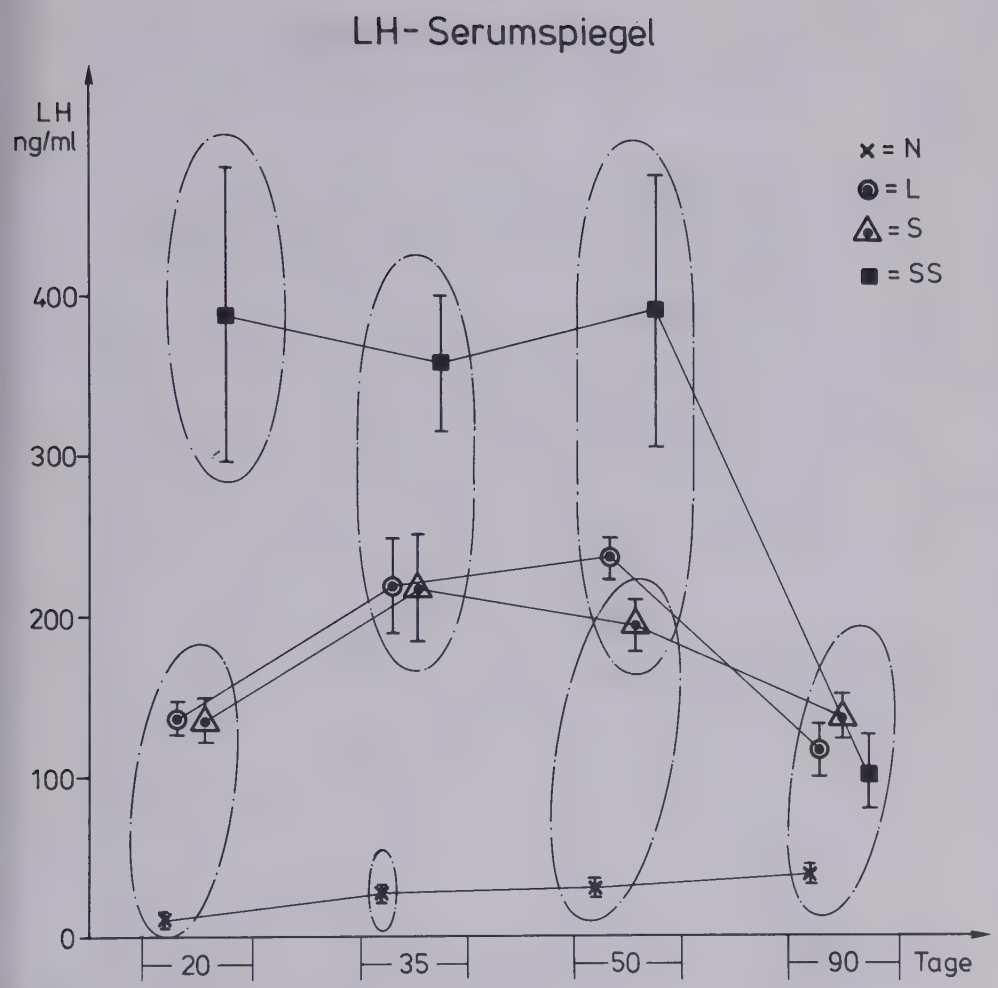


Abb. 12: LH-Serumwerte in ng/ml in den verschiedenen Altersgruppen 3o min nach i.p.-Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = superaktives LH-RH o,o4 µg/1oog KG, SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG.
Die senkrechten Striche geben $s_{\bar{x}}$ an. Oval eingerahmte Werte unterscheiden sich nicht statistisch signifikant. Die ovaläre Einrahmung ist willkürlich gewählt.
Als Interpretationsbeispiel sei das Ergebnis der 2o Tage alten Ratten erläutert: nicht signifikant unterschiedlich sind die N-, L- und S-Werte; jedoch unterscheidet sich der SS-Wert signifikant von den drei zuvor genannten (vgl. auch Interpretationsbeispiel der Abb. 1o).

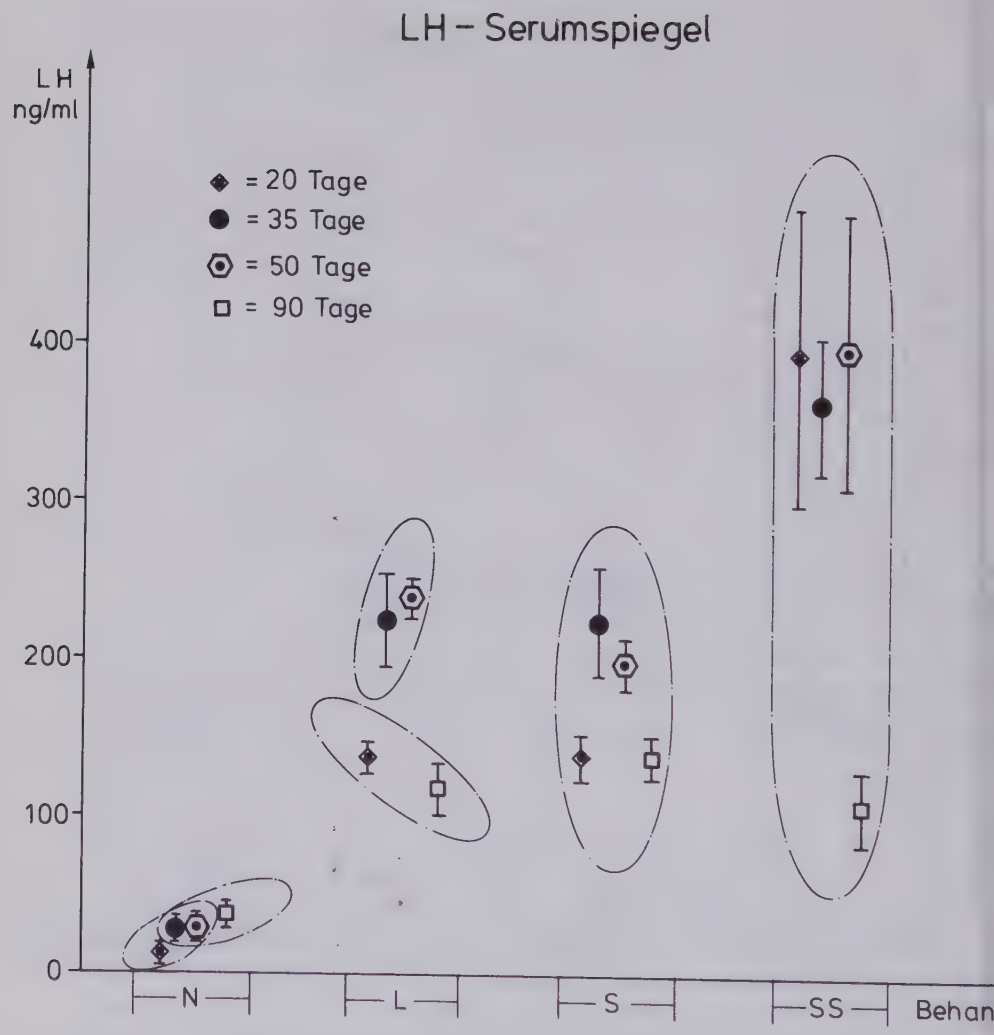


Abb. 13: LH-Serumwerte nach Behandlungsart gruppiert, Darstellung des Alters-stufeneffekts
Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = super-aktives LH-RH o,o4 µg/1oog KG, SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG.

Die senkrechten Striche geben $s_{\bar{x}}$ an. Oval eingerahmte Werte unter-scheiden sich nicht statistisch signifikant. Die ovaläre Einrahmung ist willkürlich gewählt (vgl. Interpretationsbeispiel der Abb. 1o und 12).

statistisch gesicherten Unterschied. Die L-, S- und SS-Werte der 9o Tage alten Ratten haben statistisch gesehen die gleiche Größe.

3. Ergebnisse der Metabolisierung des ^{3}H-Androstendions und des ^{14}C-Testosterons

3.1 Ergebnisberechnung

Die Radioaktivität (gemessen in c/1o' = counts pro 1o Minuten) der einzelnen Bereiche einer Bahn der großen Dünnschichtchromatographie wurde addiert und gleich 1oo% gesetzt, um danach den Prozentwert jedes einzelnen Bereichs (sprich Steroid) zu ermitteln. Vor der Summenbildung der ^{3}H-Werte wurde pro Bereich die "eingestreute" ^{14}C-Aktivität subtrahiert (s. III, 3.5 Einstellung des Scintillation-Spectrometers).
Der Prozentwert der Bereiche 3 (DHT) und 4 (A-steron) wurde mittels dem prozentualen Trennergebnis in der kleinen Dünnschichtchromatographie ausgerechnet; fand man bei der Azetat-Trennung noch T- oder Δ-4-Azetat, wurden die Werte der Bereiche 2 und 5 entsprechend korrigiert.

Die Ergebnisse geben also Prozentwerte wieder, die die einzelnen Steroide in ihrem Metabolismus nach einstündiger Inkubation repräsentieren (unter Einbeziehung nicht identifizierter Substanzen).
Für die statistische Auswertung wurden die Prozentwerte auf Lochkarten verschlüsselt. Die zweifaktorielle Varianzanalyse nach dem gekreuzten Versuchsplan wies für jedes Steroid bei der Prüfung der Haupteffekte (Altersstufe, Behandlungsart) stets ein signifikantes F resp. p für den Altersstufeneffekt auf, während der Behandlungseffekt nur beim DHT ein signifikantes F bzw. p zeigte (s. Tab. 6). War $p \leq 0{,}05$ wurde der SCHEFFE-Test angewandt.

Tab. 6: Überblick über das Signifikanzniveau der Haupteffekte (Altersstufe, Behandlungsart) für die wichtigsten Steroide. Prüfung mittels der zweifaktoriellen Varianzanalyse, vorausgesetztes Signifikanzniveau $p \leq 0{,}05$.

	Substrat: ^{3}H-Δ-4		Substrat: ^{14}C-T	
	Altersstufen-effekt	Behandlungs-effekt	Altersstufen-effekt	Behandlungs-effekt
T	F: 1o3,22 p: o,oo1	F: 2,36 p: o,o77	F: 115,93 p: o,oo1	F: o,89 p: o,999
DHT	F: 8o,68 p: o,oo1	F: 9,32 p: o,oo1	F: 92,17 p: o,oo1	F: 9,1o p: o,oo1
DIOL	F: 142,47 p: o,oo1	F: 1,5o p: o,221	F: 2o9,1o p: o,oo1	F: 2,32 p: o,o8o
$\sum$ DHT DIOL A-steron	F: 166,38 p: o,oo1	F: 1,87 p: o,141	F: 195,78 p: o,oo1	F: 1,77 p: o,159

3.2 Anmerkungen zu versuchsspezifischen Umständen

Als wichtigste unbekannte Größen der Ausgangsbedingungen zu Beginn der Inkubation sind die unterschiedlichen Substrat- und Enzymkonzentrationen zu nennen. Da die Kenntnis sowohl über die Konzentration des Testosterons und seiner Metabolite als auch über die Menge der abbauenden Enzyme fehlte, ist nicht bekannt, in welchem Enzym-Substrat-Sättigungsverhältnis die Reaktion ablief (vgl. dazu Ausführungen in der Diskussion unter 2.1 Bewertung der Methode, ad Inkubation).

Einen Anhalt über das Enzym-Substrat-Sättigungsverhältnis liefert der Prozentwert an wiedergefundener Aktivität der zugeführten Substrate, also der Prozentsatz nicht metabolisiertem ^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T. Beträgt er mehr als 5o%, so kann man von einem eher gesättigten Verhältnis ausgehen. Sämtliche Ergebnisse an wiedergefundener Aktivität für ^{3}H-Δ-4 sind kleiner als 5o%; daraus darf gefolgert werden, daß in vivo das Enzymsystem nicht mit Δ-4 gesättigt ist. Anders liegen die Verhältnisse beim T. Mit Ausnahme der 35 Tage alten

Ratten betragen alle ^{14}C-T-Werte mehr als 5o%, folglich liegt hier in vivo ein mit T eher gesättigtes Enzymsystem vor (s. Tab. 13).
Im Experiment unterschiedlich aufgefundene Mengen der Metabolite können somit zum einen von verschieden hohen Enzymaktivitäten herrühren, zum anderen aber auch Folge einer unterschiedlichen Enzym-Substrat-Konzentration sein. Beim Vergleich der Ergebnisse innerhalb einer Altersgruppe spielen diese verschiedenen Ausgangskonzentrationen wahrscheinlich eine geringere Rolle als beim Vergleich zwischen den Altersgruppen, jedoch müssen diese Umstände bei der Interpretation der Ergebnisse stets mitbetrachtet werden.

3.3 Darstellung der Ergebnisse

Die folgenden Tabellen geben die in jeder Altersstufe und für jedes Substrat wiedergefundene Radioaktivität der Metabolite an:

Tab. 7: Ergebnisse der Metabolisierung von ^{3}H-Androstendion und ^{14}C-Testosteron nach Inkubation des gepoolten Hodenhomogenats (vgl. Tab. 1, im Mittel 68o mg) bei 2o Tage alten Ratten.
Darstellung in Abhängigkeit der Behandlung (Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = superaktives LH-RH o,o4 µg/1oo g KG, SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG).
Alle Zahlenwerte in % der aufgefundenen Radioaktivität; $\bar{x}$ aus 6 oder 5 Versuchsansätzen. In Klammern ist die Standardabweichung angegeben.

Substrat: ^{3}H-Androstendion

	N	L	S	SS
Δ-4	34,76 (33,76)	18,13 (1o,81)	12,84 (5,o8)	3o,42 (17,14)
T	39,69 (23,29)	49,36 (4,77)	37,4o (8,oo)	38,43 (8,19)
DIOL	9,88 (9,17)	14,35 (6,78)	21,36 (5,55)	11,55 (5,88)
DHT	5,19 (4,71)	6,58 (1,58)	12,oo (2,o8)	1o,46 (4,31)
A-steron	2,66 (1,88)	4,7o (2,22)	8,36 (5,o2)	2,39 (2,46)
DION	o,99 (o,2o)	1,27 (o,19)	1,78 (o,52)	1,82 (o,31)
5α-red. Metabolite =Σ DIOL,DHT,A-steron,DION	18,72	26,9o	43,5o	26,22
unbekannter Bereich	7,33	5,61	6,26	4,93
Anzahl der Vers.-ansätze	6	6	5	6

Substrat: ^{14}C-Testosteron

	N	L	S	SS
T	72,72 (19,o4)	63,97 (1o,48)	45,8o (9,88)	64,26 (14,o6)
Δ-4	2,46 (o,77)	3,23 (o,35)	2,41 (o,66)	2,25 (o,16)
DIOL	14,3o (13,46)	19,7o (6,81)	3o,2o (8,67)	21,o2 (1o,57)
DHT	5,55 (4,22)	7,96 (1,98)	14,72 (1,72)	9,87 (3,81)
A-steron	o,53 (o,33)	o,92 (o,58)	1,97 (1,42)	o,22 (o,2o)
DION	o,18 (o,o7)	o,27 (o,1o)	o,38 (o,15)	o,23 (o,o6)
5α-red. Metabolite =ΣDIOL,DHT,A-steron,DION	2o,56	28,85	47,27	31,34
unbekannter Bereich	4,26	3,95	4,52	2,15
Anzahl der Vers.-ansätze	6	6	5	6

Tab. 8: Ergebnisse der Metabolisierung von ^{3}H-Androstendion und ^{14}C-Testosteron nach Inkubation von 1ooo mg gepooltem Hodenhomogenat (vgl. Tab. 1) bei 35 Tage alten Ratten.
Darstellung in Abhängigkeit der Behandlung (Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = superaktives LH-RH o,o4 µg/1oog KG, SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG).
Alle Zahlenwerte in % der aufgefundenen Radioaktivität; $\bar{x}$ aus 6 Versuchsansätzen. In Klammern ist die Standardabweichung angegeben.

Substrat: ^{3}H-Androstendion

	N	L	S	SS
Δ-4	8,13 (2,91)	6,95 (1,72)	12,35 (8,38)	5,96 (1,57)
T	22,55 (8,64)	15,4o (5,41)	27,78 (1o,9o)	9,52 (5,56)
DIOL	36,14 (8,51)	47,25 (7,o2)	34,o8 (12,88)	49,92 (5,82)
DHT	8,o3 (1,65)	1o,76 (1,94)	9,35 (2,76)	14,66 (3,66)
A-steron	12,45 (5,o3)	13,45 (1,89)	1o,42 (3,61)	13,58 (4,1o)
DION	3,18 (2,66)	2,o7 (o,3o)	1,85 (o,52)	2,64 (2,64)
5 -red. Metabolite =Σ DIOL,DHT,A-steron,DION	59,8o	74,76	55,7o	8o,8o
unbekannter Bereich	9,52	2,89	4,17	3,72
Anzahl der Vers.-ansätze	6	6	6	6

Substrat: ^{14}C-Testosteron

	N	L	S	SS
T	24,o7 (9,12)	15,1o (6,41)	3o,94 (16,69)	9,o8 (5,39)
Δ-4	3,31 (1,44)	2,38 (o,86)	3,64 (1,21)	1,67 (o,52)
DIOL	5o,35 (8,24)	64,43 (3,14)	46,59 (14,22)	65,55 (3,34)
DHT	11,55 (1,45)	1o,58 (3,22)	12,12 (4,2o)	16,oo (3,o7)
A-steron	5,96 (3,17)	4,61 (2,o7)	3,88 (2,58)	4,91 (2,13)
DION	1,44 (1,3o)	o,78 (o,19)	o,55 (o,18)	1,o1 (o,39)
5 -red. Metabolite =Σ DIOL,DHT,A-steron,DION	69,3o	8o,73	63,14	87,34
unbekannter Bereich	3,32	1,79	2,28	1,91
Anzahl der Vers.-ansätze	6	6	6	6

Tab. 9: Ergebnisse der Metabolisierung von ^{3}H-Androstendion und ^{14}C-Testosteron nach Inkubation von 1ooo mg gepooltem Hodenhomogenat (vgl. Tab. 1) bei 5o Tage alten Ratten.
Darstellung in Abhängigkeit der Behandlung (Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = superaktives LH-RH o,o4 µg/1oog KG, SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG).
Alle Zahlenwerte in % der aufgefundenen Radioaktivität; $\bar{x}$ aus 6 oder 5 Versuchsansätzen. In Klammern ist die Standardabweichung angegeben.

Substrat: ^{3}H-Androstendion

	N	L	S	SS
Δ-4	9,79 (1,42)	11,65 (2,33)	11,97 (1,15)	1o,28 (1,12)
T	46,95 (9,33)	5o,65 (1o,o9)	51,11 (6,55)	48,7o (9,o4)
DIOL	28,47 (8,o5)	22,98 (7,oo)	2o,12 (3,87)	25,91 (7,38)
DHT	4,59 (1,9o)	4,47 (1,38)	7,68 (1,62)	5,o9 (1,5o)
A-steron	3,6o (o,56)	3,76 (1,26)	2,45 (1,13)	3,55 (1,o8)
DION	o,66 (o,1o)	o,62 (o,13)	o,86 (o,22)	o,68 (o,68)
5α-red. Metabolite = ΣDIOL,DHT,A-steron,DION	37,32	31,83	31,o5	35,23
unbekannter Bereich	5,94	5,87	5,87	5,79
Anzahl der Vers.-ansätze	6	6	5	6

Substrat: ^{14}C-Testosteron

	N	L	S	SS
T	5o,o7 (9,25)	53,12 (1o,77)	53,65 (7,22)	51,89 (9,54)
Δ-4	8,31 (1,42)	1o,69 (9,42)	1o,44 (1,4o)	8,55 (1,82)
DIOL	27,53 (8,oo)	22,35 (7,o6)	18,46 (3,88)	25,o9 (7,63)
DHT	5,99 (2,3o)	5,o9 (2,87)	9,36 (2,oo)	6,48 (1,95)
A-steron	3,29 (o,48)	4,13 (2,21)	3,o9 (2,11)	3,47 (1,o9)
DION	o,41 (o,o7)	o,51 (o,15)	o,85 (o,21)	o,5o (o,13)
5α-red. Metabolite = ΣDIOL,DHT,A-steron,DION	37,22	32,o8	31,76	35,54
unbekannter Bereich	4,4o	4,11	4,15	4,o2
Anzahl der Vers.-ansätze	6	6	5	6

Tab. 1o: Ergebnisse der Metabolisierung von ^{3}H-Androstendion und ^{14}C-Testosteron nach Inkubation von 1ooo mg Hodenhomogenat (vgl. Tab. 1) bei 9o Tage alten Ratten.
Darstellung in Abhängigkeit der Behandlung (Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = superaktives LH-RH o,o4 µg/1oog KG, SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG).
Alle Zahlenwerte in % der aufgefundenen Radioaktivität; $\bar{x}$ aus 6 oder 5 Versuchsansätzen. In Klammern ist die Standardabweichung angegeben.

Substrat: ^{3}H-Androstendion

	N	L	S	SS
Δ-4	18,72 (1o,61)	11,o5 (7,67)	13,49 (o,94)	16,52 (2,15)
T	65,52 (8,86)	7o,oo (1o,77)	71,24 (2,o1)	64,67 (2,52)
DIOL	3,86 (1,o2)	4,46 (1,32)	2,o1 (o,9o)	1,9o (o,41)
DHT	o,41 (o,41)	o,58 (o,24)	o,72 (o,13)	o,65 (o,14)
A-steron	o,38 (o,17)	o,51 (o,1o)	o,56 (o,15)	o,63 (o,14)
DION	o,2o (o,1o)	o,23 (o,o9)	o,45 (o,o9)	o,67 (o,24)
5α-red. Metabolite =Σ DIOL,DHT,A-steron,DION	4,85	5,78	3,74	3,85
unbekannter Bereich	1o,91	13,17	11,53	14,96
Anzahl der Vers.-ansätze	6	6	5	6

Substrat: ^{14}C-Testosteron

	N	L	S	SS
T	7o,98 (9,59)	75,79 (9,56)	78,34 (2,2o)	72,98 (3,o1)
Δ-4	18,45 (1o,95)	11,38 (8,45)	12,73 (1,17)	15,27 (1,81)
DIOL	3,4o (o,96)	3,98 (1,28)	2,o6 (o,92)	1,94 (o,46)
DHT	o,43 (o,43)	o,62 (o,22)	o,69 (o,18)	o,67 (o,12)
A-steron	o,4o (o,28)	o,5o (o,15)	o,46 (o,13)	o,56 (o,o8)
DION	o,1o (o,o6)	o,14 (o,o8)	o,19 (o,o6)	o,4o (o,24)
5α-red. Metabolite =Σ DIOL,DHT,A-steron,DION	4,33	5,24	3,4o	3,57
unbekannter Bereich	6,24	7,59	5,53	8,18
Anzahl der Vers.-ansätze	6	6	5	6

Für den Metaboliten ^{3}H-T sind nachfolgend die gefundenen Werte auch noch analog der varianzanalytischen Datenverrechnung (Zeileneffekt = Altersstufe, Spalteneffekt = Behandlungsart) zusammengefaßt. Vgl. dazu Ausführungen 3.8.

Tab. 11: Wiedergefundene Radioaktivität (in %) von ^{3}H-T nach Inkubation von ^{3}H-Δ-4 im Hodenhomogenat verschieden alter und verschieden behandelter Ratten: Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = superaktives LH-RH o,o4 µg/1oog KG und SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG.
Aufgeführt ist das arithmetische Mittel aus 6 Bestimmungen, nach Altersstufe (Zeilen) in Abhängigkeit der Behandlungsart (Spalten) gruppiert. In Klammern ist die Standardabweichung wiedergegeben. Für statistische Zwecke sind die Zeilen- und Spaltenmittel sowie deren Abweichen vom Gesamtmittel aufgeführt.

	Behandlungsart: N	L	S	SS	Zeilenmittel=ZM (ZM-G
Rattenalter: 2o d	39,69 (23,29)	49,36 (4,77)	37,4o (8,oo)	38,43 (8,19)	41,39 (-2,63)
35 d	22,55 (8,64)	15,4o (5,41)	27,78 (1o,9o)	9,52 (5,56)	18,81 (-25,21)
5o d	46,95 (9,33)	5o,65 (1o,o9)	51,11 (6,55)	48,7o (9,o4)	49,27 (5,25)
9o d	65,52 (8,86)	7o,oo (1o,77)	71,24 (2,o1)	64,67 (2,25)	67,71 (23,69)
Spaltenmittel=SM (SM - GM)	43,68 (-o,34)	46,35 (2,33)	45,97 (1,95)	4o,33 (-3,69)	44,o2 = GM= Gesamtmittel

Die Verstoffwechselung der beiden Substrate zu den zwei wichtigsten 5α-reduzierten Metaboliten, dem DHT und DIOL, sowie zur Summe aus DIOL, DHT und A-steron ist den nachfolgenden Diagrammen zu entnehmen. Dargestellt ist jeweils zuerst die Biokonversion, geordnet nach Alter in Abhängigkeit der Behandlung (Behandlungseffekt); hierauf folgt die Darstellung des Metabolismus, geordnet nach Behandlungsart in Abhängigkeit des Alters (Altersstufeneffekt).

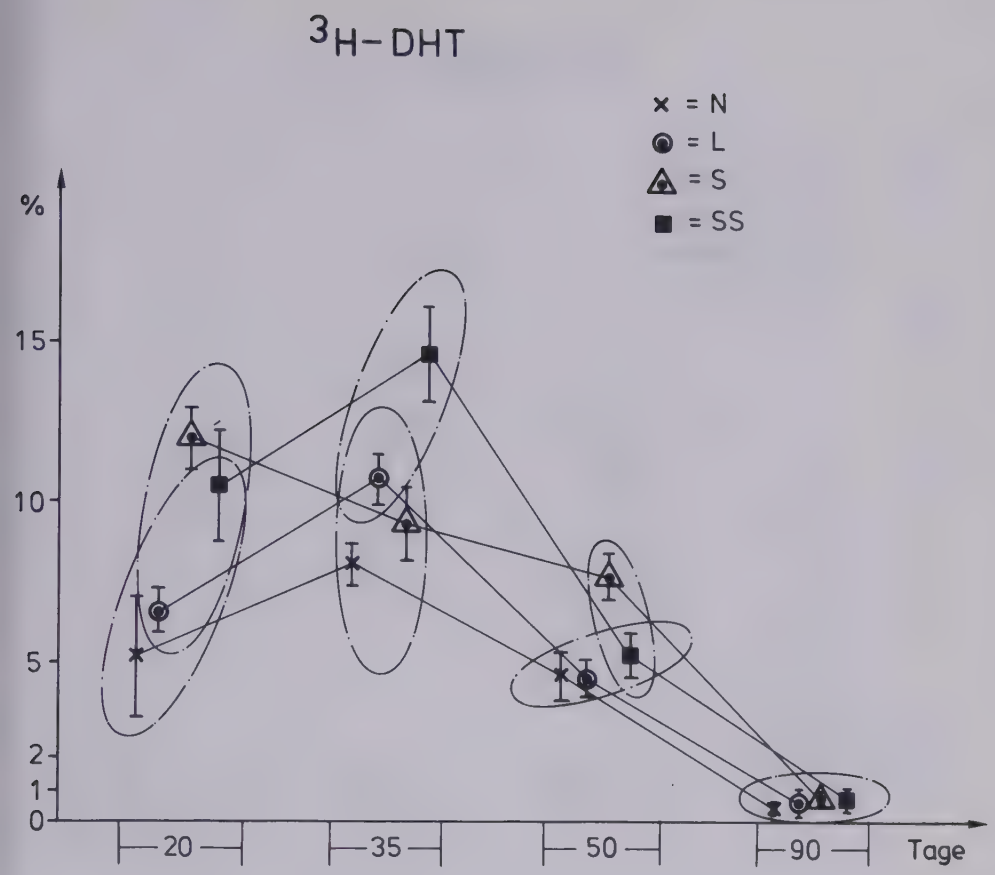


Abb. 14: Darstellung der wiedergefundenen Radioaktivität in % von ^{3}H-DHT in den vier Altersstufen nach Inkubation des Hodenhomogenats mit ^{3}H-Δ-4.

Aufzeichnung des Behandlungseffekts, Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = superaktives LH-RH o,o4 µg/1oog KG, SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG.
Die senkrechten Striche geben $s_{\bar{x}}$ an. Oval eingerahmte Werte unterscheiden sich nicht statistisch signifikant. Die ovaläre Einrahmung ist willkürlich gewählt (vgl. Interpretationsbeispiel der Abb. 1o und 12).

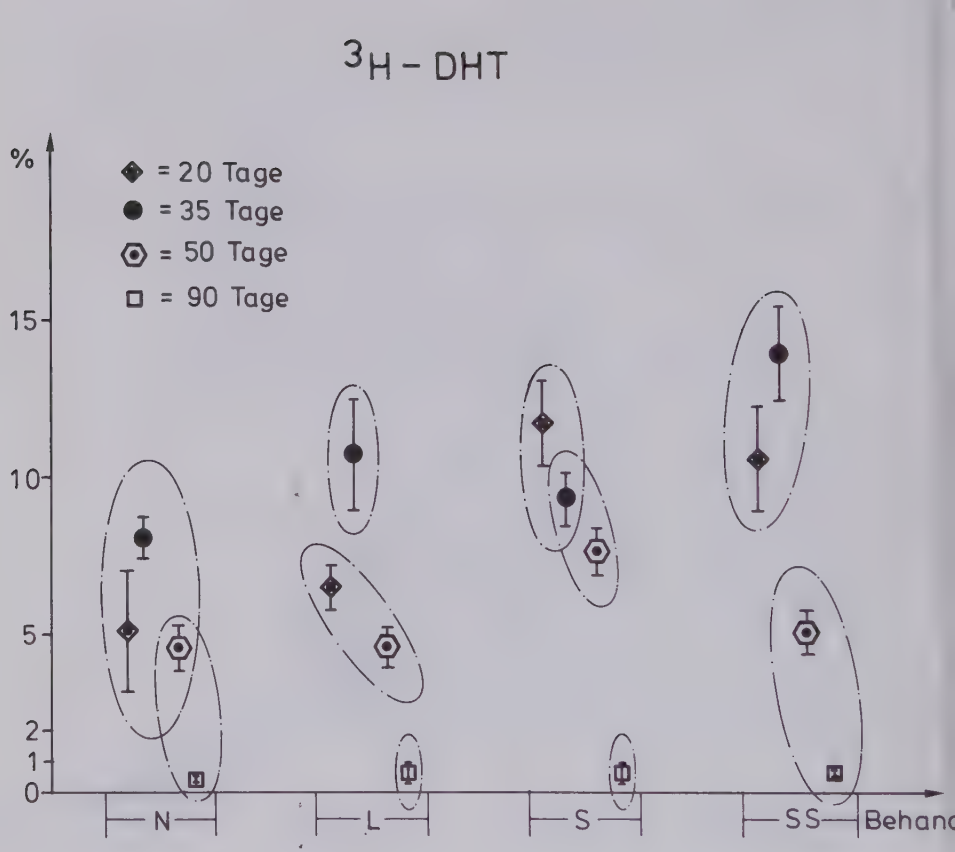


Abb. 15: ^{3}H-DHT-Werte nach Behandlungsart gruppiert, Darstellung des Alters-stufeneffekts. Nähere Angaben siehe Legende der Abb. 14

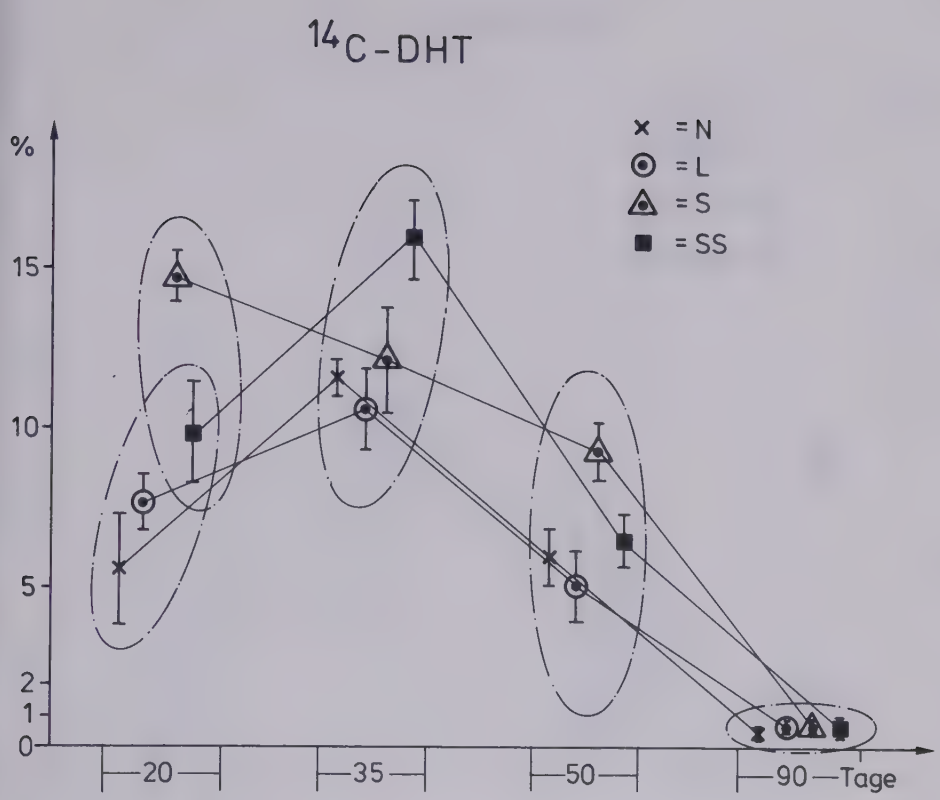


Abb. 16: Darstellung der wiedergefundenen Radioaktivität in % von ^{14}C-DHT in den vier Altersstufen nach Inkubation des Hodenhomogenats mit ^{14}C-Testosteron.
Aufzeichnung des Behandlungseffekts, Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = superaktives LH-RH o,o4 µg/1oog KG, SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG.
Die senkrechten Striche geben $s_{\bar{x}}$ an. Oval eingerahmte Werte unterscheiden sich nicht statistisch signifikant. Die ovaläre Einrahmung ist willkürlich gewählt (vgl. Interpretationsbeispiel der Abb. 1o und 12).

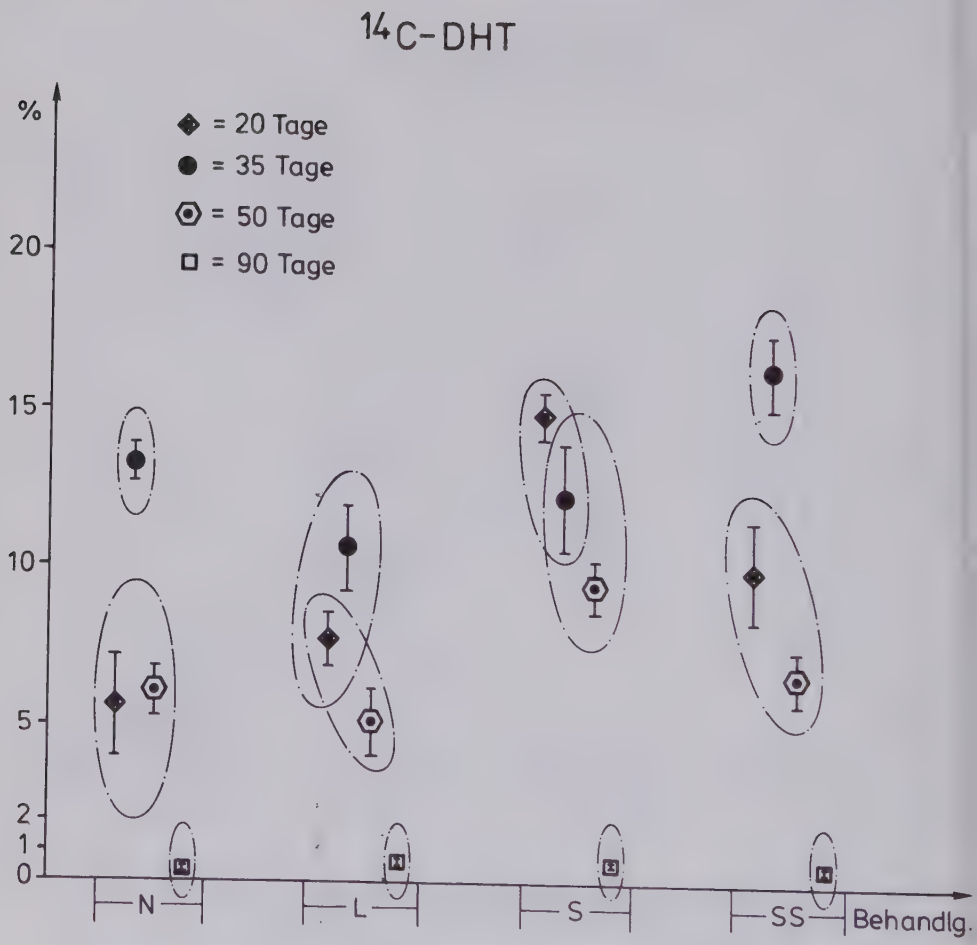


Abb. 17: ^{14}C-DHT-Werte nach Behandlungsart gruppiert, Darstellung des Alters-stufeneffekts. Nähere Angaben siehe Legende der Abb. 16

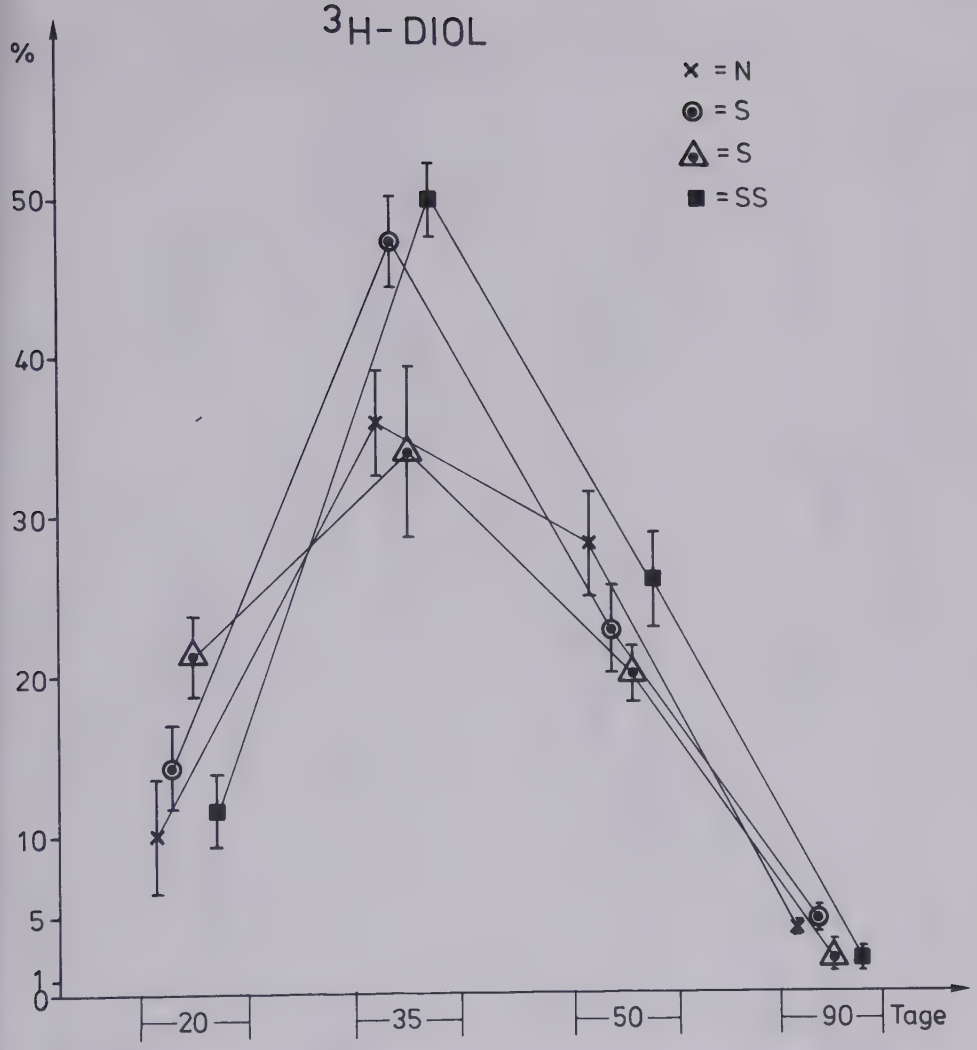


Abb. 18: Darstellung der wiedergefundenen Radioaktivität in % von ^{3}H-DIOL in den vier Altersstufen nach Inkubation des Hodenhomogenats mit ^{3}H-Δ-4.

Aufzeichnung des Behandlungseffekts, Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = superaktives LH-RH o,o4 µg/1oog KG, SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG.
Die senkrechten Striche geben $s_{\bar{x}}$ an. Die varianzanalytische Prüfung der Werte konnte keinen signifikanten Behandlungseffekt nachweisen.

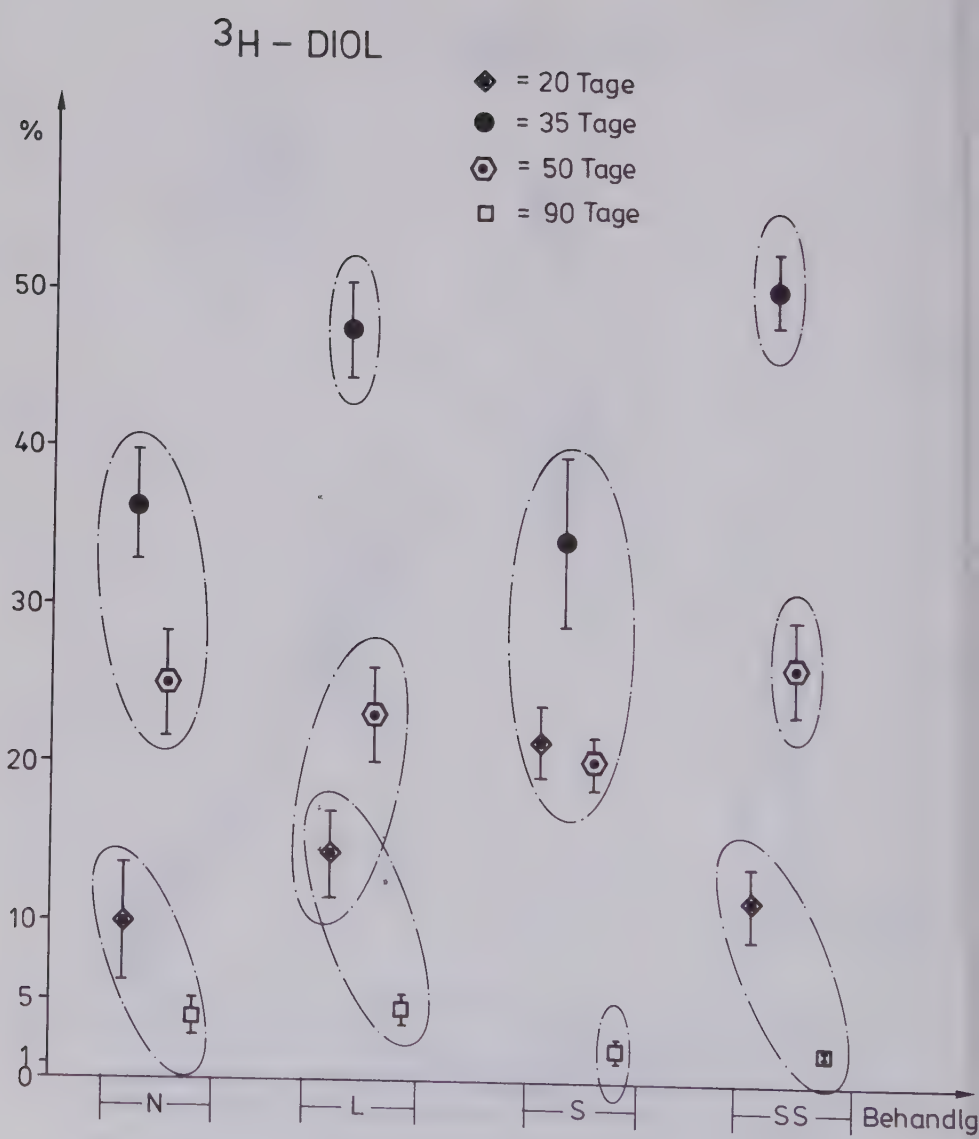


Abb. 19: ^{3}H-DIOL-Werte nach Behandlungsart gruppiert, Darstellung des Alters-stufeneffekts. Nähere Angaben siehe Legende der Abb. 18 und 14

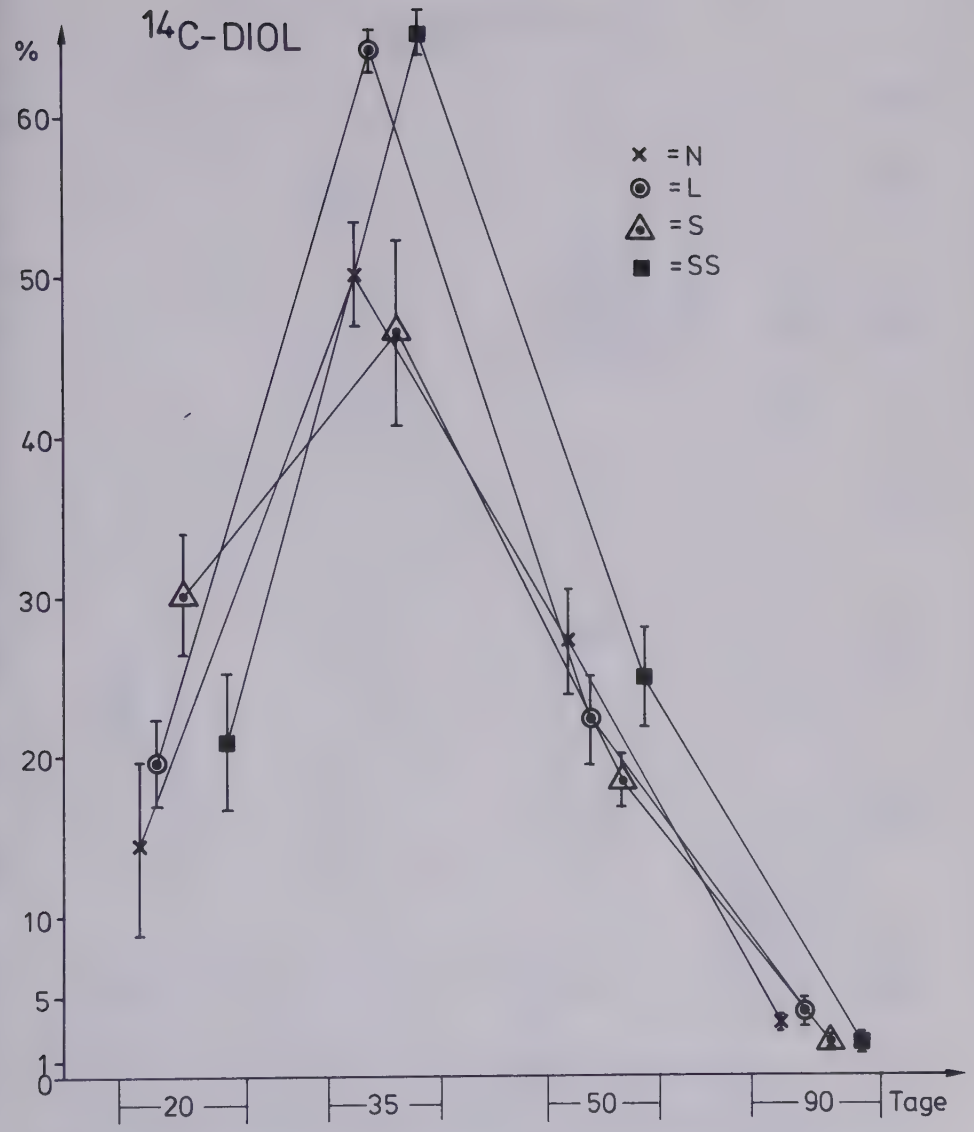


Abb. 2o: Darstellung der wiedergefundenen Radioaktivität in % von ^{14}C-DIOL in den vier Altersstufen nach Inkubation des Hodenhomogenats mit ^{14}C-T.

Aufzeichnung des Behandlungseffekts, Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = superaktives LH-RH o,o4 µg/1oog KG, SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG.
Die senkrechten Striche geben $s_{\bar{x}}$ an. Die varianzanalytische Prüfung der Werte konnte keinen signifikanten Behandlungseffekt nachweisen.

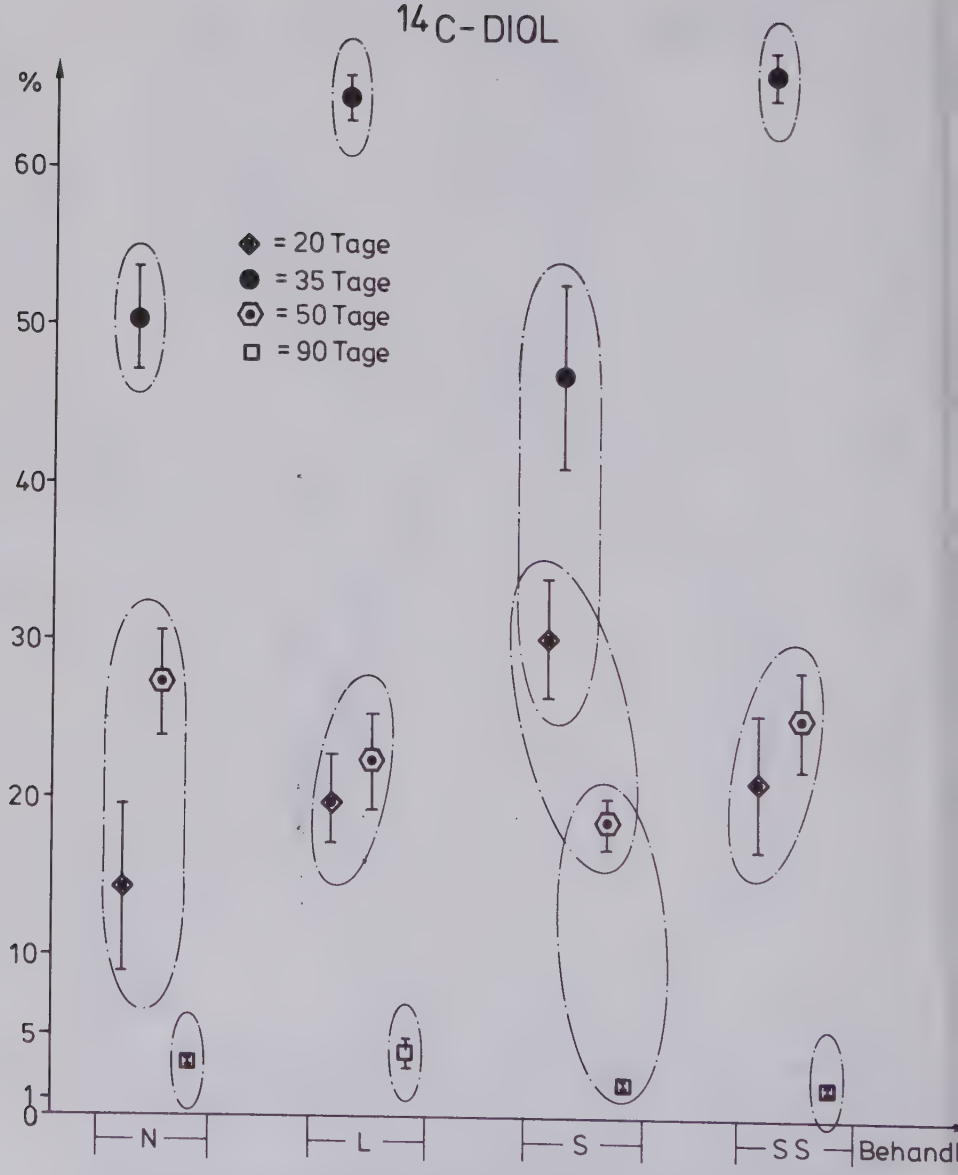


Abb. 21: ^{14}C-DIOL-Werte nach Behandlungsart gruppiert, Darstellung des Altersstufeneffekts. Nähere Angaben siehe Legende der Abb. 2o und 14

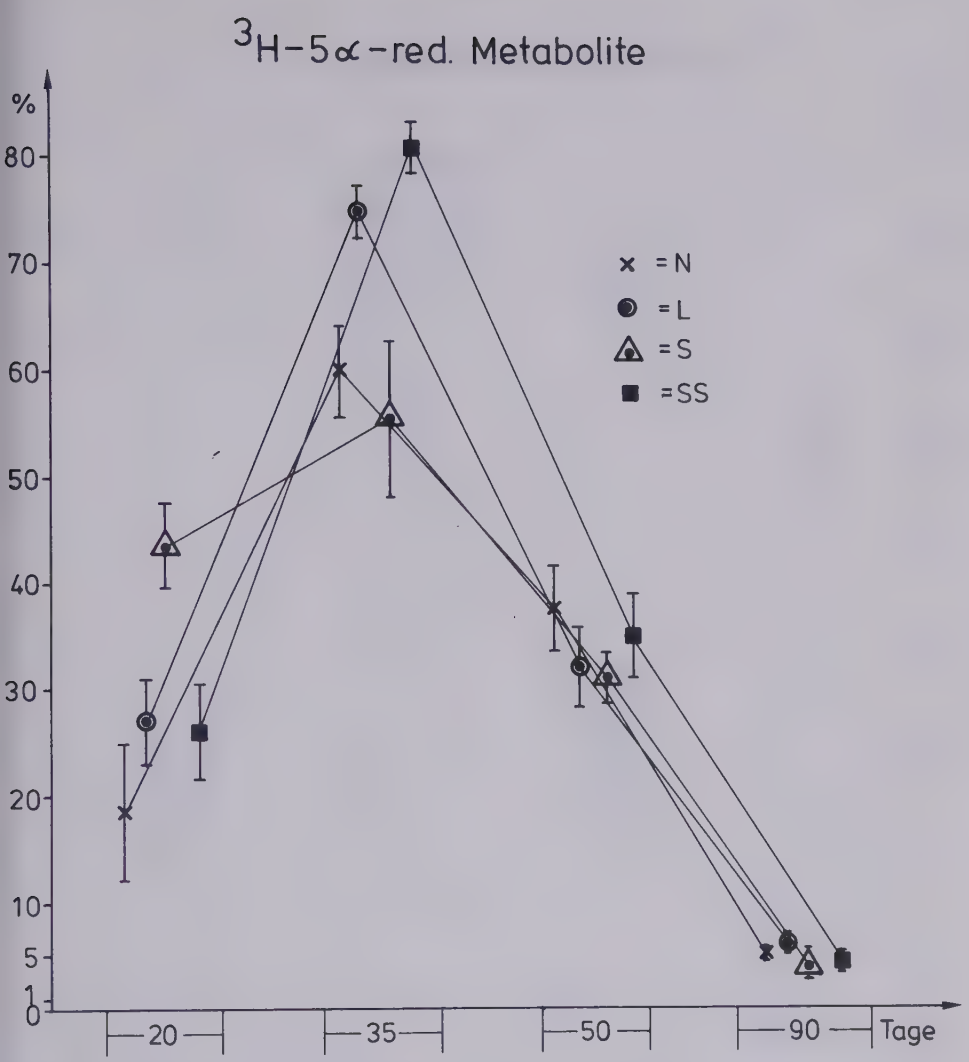


Abb. 22: Darstellung der wiedergefundenen Radioaktivität in % der wichtigsten ^{3}H-5α-reduzierten Metabolite (Summe von DHT, DIOL und A-steron) in den vier Altersstufen nach Inkubation des Hodenhomogenats mit ^{3}H-Δ-4.

Aufzeichnung des Behandlungseffekts, Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = superaktives LH-RH o,o4 µg/1oog KG, SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG.
Die senkrechten Striche geben $s_{\bar{x}}$ an. Die varianzanalytische Prüfung der Werte konnte keinen signifikanten Behandlungseffekt nachweisen.

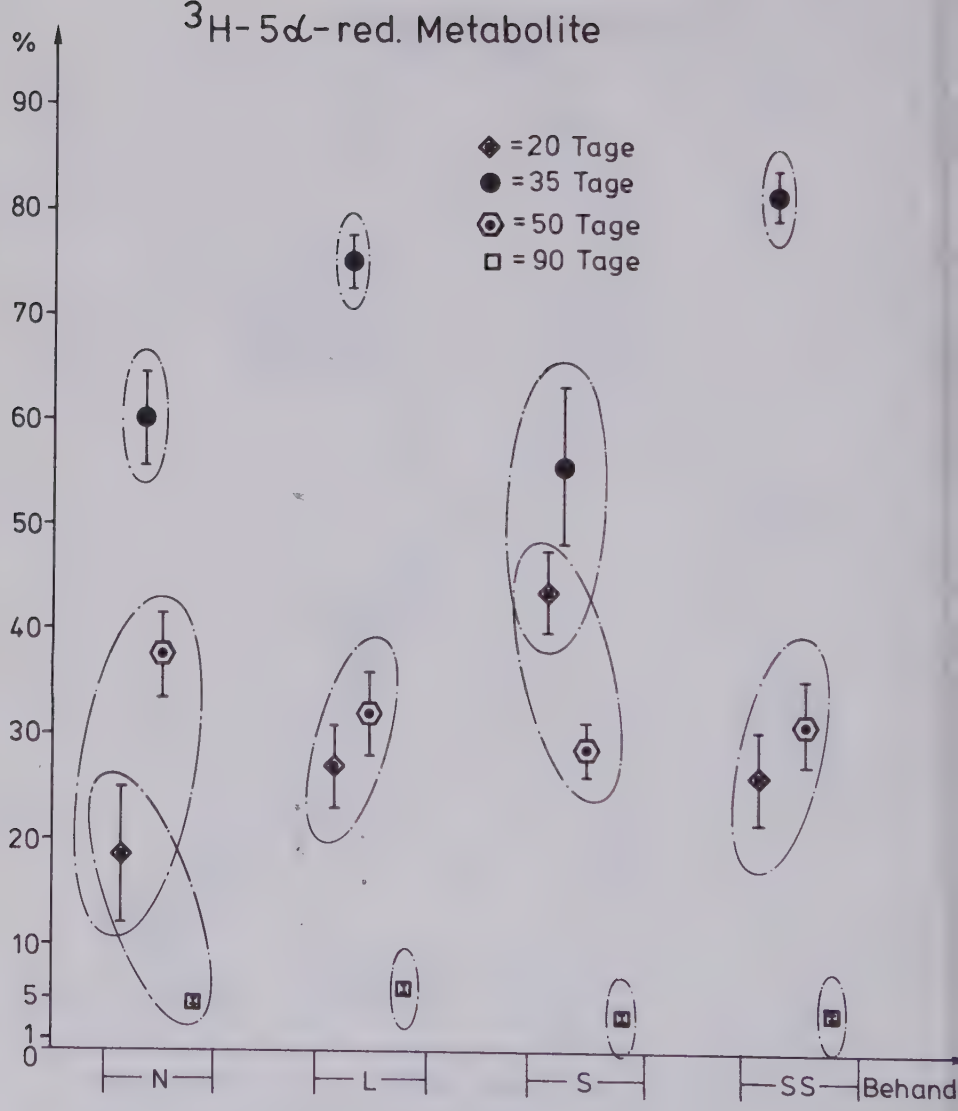


Abb. 23: Werte der wichtigsten ^{3}H-5α-reduzierten Metabolite (Summe von DHT, DIOL und A-steron) nach Behandlungsart gruppiert, Darstellung des Alterstufeneffekts. Nähere Angaben siehe Legende der Abb. 22 und 14

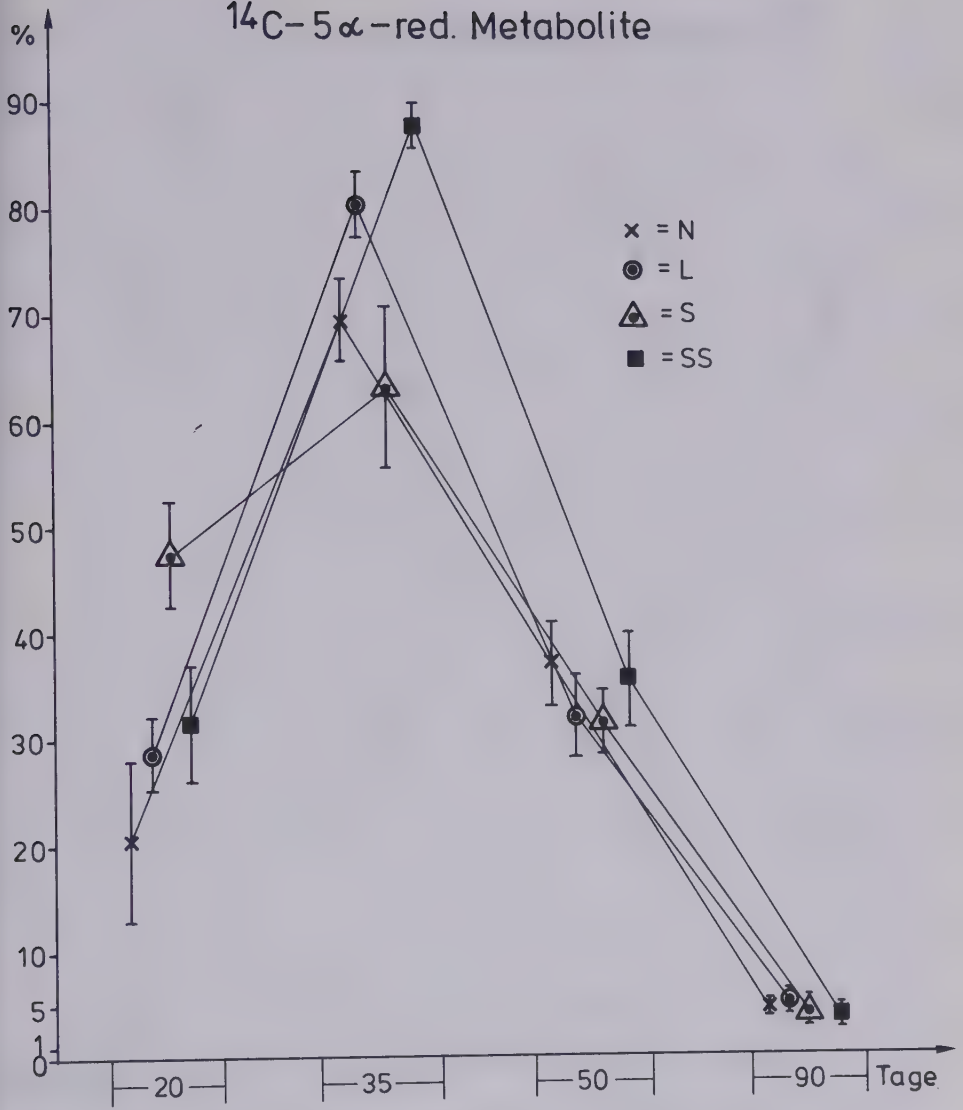


Abb. 24: Darstellung der wiedergefundenen Radioaktivität in % der wichtigsten ^{14}C-5α-reduzierten Metabolite (Summe von DHT, DIOL und A-steron) in den vier Altersgruppen nach Inkubation des Hodenhomogenats mit ^{14}C-T.

Aufzeichnung des Behandlungseffekts, Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = superaktives LH-RH o,o4 µg/1oog KG, SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG.
Die senkrechten Striche geben $s_{\bar{x}}$ an. Die varianzanalytische Prüfung der Werte konnte keinen signifikanten Behandlungseffekt nachweisen.

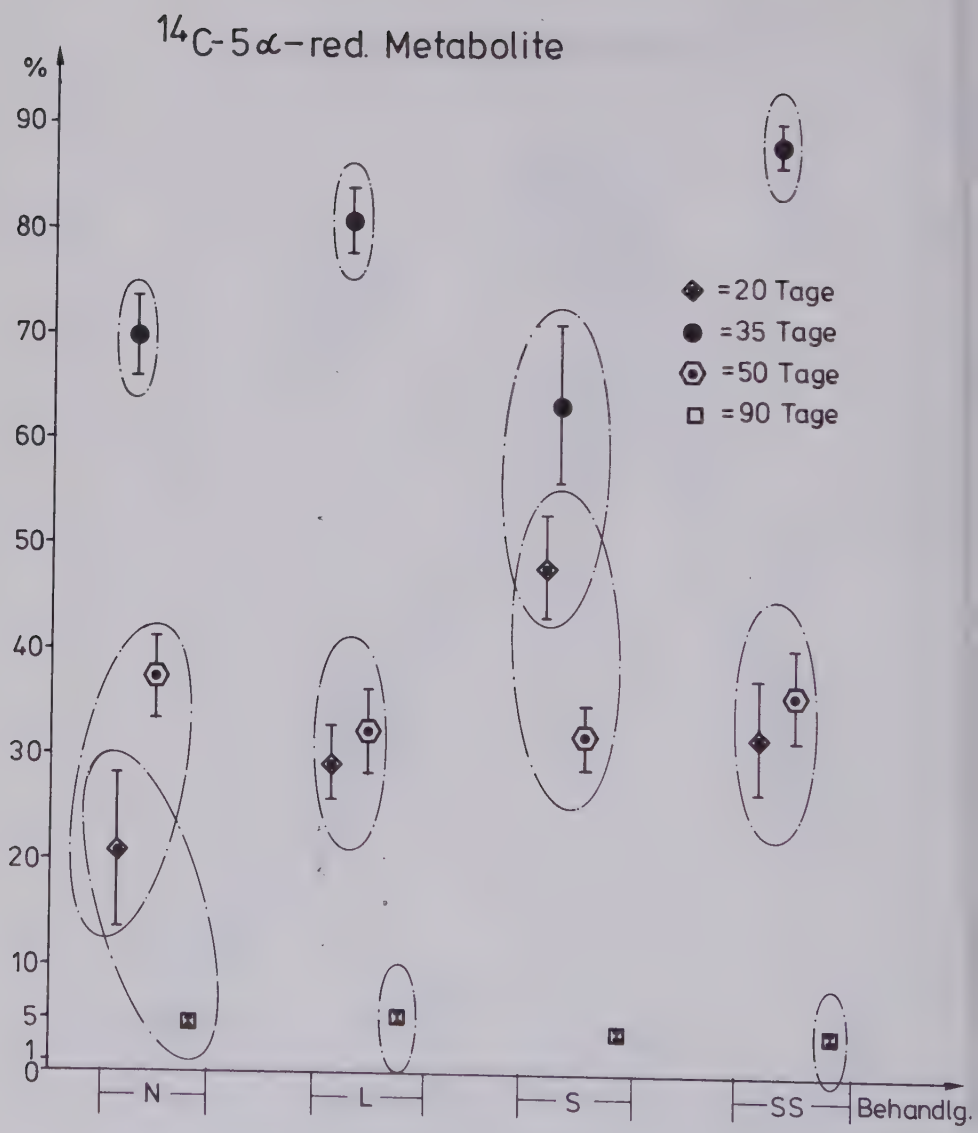


Abb. 25: Werte der wichtigsten ^{14}C-5α-reduzierten Metabolite (Summe von DHT, DIOL und A-steron) nach Behandlungsart gruppiert, Darstellung des Altersstufeneffekts. Nähere Angaben siehe Legende der Abb. 24 und 14

3.4 Altersabhängige Metabolisierung von ^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T, Ergebnisse der Kontrollgruppe (N-Behandlung)

Siehe Tab. 7 bis 1o und Abb. 15, 17, 19, 21, 23, 25.

Die Umsetzung von ^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T zeigt bei den mit Kochsalz behandelten Kontrolltieren einen klaren altersabhängigen Effekt. Die höchste Metabolisierungsrate zeigen die pubertierenden 35 Tage alten Ratten, gefolgt von den am Ende der Pubertät stehenden 5o Tage alten Ratten; nur wenig darunter liegt die Verstoffwechselung bei den präpubertären 2o Tage alten Ratten, während die erwachsenen 9o Tage alten Ratten mit Abstand am wenigsten Substrat umsetzen (s. Tab. 13, vgl. dazu 3.2 Anmerkungen).
Gemäß des Δ-4-Abbaus tritt als erster Hauptmetabolit des ^{3}H-Δ-4 das T auf, dessen Menge sowohl abhängig ist von der Aktivität resp. Menge der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase als auch abhängig ist vom weiteren Abbau des T im 17-Hydroxy-Weg (vgl. Einleitung). Um das Δ-4 als Substrat konkuriert auch noch die Δ-4-5α-Reduktase (17-Keto-Weg), deren Aktivität zwar bei den pubertierenden Ratten am höchsten ist (31), jedoch sind nach Steinberger (62) die 5α-reduzierten Androgene nach Inkubation von Δ-4 überwiegend Produkte der Testosteron-Reduktion (17-Hydroxy-Weg). Man findet bei den jüngsten Tieren ^{3}H-T zu 36,69% und bei den 35 Tage alten Tieren zu 22,55% als Ausdruck der hohen weiteren Verstoffwechselung. Bei den 5o Tage alten Tieren wurden 46,95% ^{3}H-T und bei den erwachsenen Tieren 65,52% ^{3}H-T entdeckt.

Die wiedergefundene Summe der ^{3}H-5α-reduzierten Metabolite ist bei den beiden jüngsten Altersstufen (18,72% und 59,8o%) niedriger als die der ^{14}C-5α-reduzierten Metabolite (2o,56% und 69,3o%), bei den beiden ältesten Altersstufen dagegen praktisch gleich (37,32% und 4,85% verglichen mit 37,22% und 4,33%). Aus Abb. 23 und 25 geht hervor, daß die Summe der 5α-reduzierten Produkte bei den 35 Tage alten Ratten signifikant über der Summe jeder anderen Altersstufe liegt. Die zweithöchste Summe weisen die 5o Tage alten Tiere auf, jedoch mit derselben Signifikanz wie die dritthöchste Summe der 2o Tage alten Tiere.

Die niedrigste Summe zeigen die 9o Tage alten Tiere, signifikant niedriger als die 35 und 5o Tage alten Ratten, doch nicht signifikant unterschiedlich vom Ergebnis der 2o Tage alten Ratten.

Betrachtet man die 5α-reduzierten Metabolite, so sieht man, daß stets das DIOL mit großem Abstand an erster Stelle auftritt, wobei die Menge des ^{3}H-DIOL in der Größenordnung des ^{14}C-DIOL liegt und die Hälfte (bei den 2o Tage alten Ratten) bis 4/5 (bei den 9o Tage alten Ratten) der 5α-reduzierten Produkte ausmacht. An zweiter Stelle rangiert das DHT, welches rund ein Drittel (2o Tage alten Tiere) bis ein Zehntel (9o Tage alten Tiere) der 5α-reduzierten Metabolite bildet; wiederum entspricht die ^{3}H-DHT-Menge ungefähr der des ^{14}C-DHT. Etwas weniger als DHT wird das A-steron entdeckt (Ausnahme ^{3}H-A-steron der 35 Tage alten Tiere). Das DION wird in vernachlässigbar geringen Mengen aufgefunden. Aus diesem Grunde wurde für die statistische Berechnung lediglich die Summe von DIOL, DHT und A-steron gebildet.

Ein direkter Vergleich zwischen der 5α-Reduzierung von ^{14}C-T und ^{3}H-T zeigt eine näherungsweise gleiche Verstoffwechselung beider Substrate zu DIOL und DHT (s. Tab. 12).

Tab. 12: Verhältnis von T : DHT : DIOL (gerundete Werte der wiedergefundenen prozentualen Radioaktivität) in den verschiedenen Altersstufen der Kontrollgruppe nach einstündiger Inkubation des Hodenhomogenats mit ^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T.

Rattenalter:	^{3}H-T :	^{3}H-DHT :	^{3}H-DIOL		^{14}C-T :	^{14}C-DHT :	^{14}C-DIOL
9o d	66 :	o,4 :	3,9	≈	71 :	o,4 :	3,4
5o d	47 :	5 :	28	≈	5o :	6 :	28
35 d	23 :	8 :	36	≈	24 :	12 :	5o
2o d	4o :	5 :	1o	≈	73 :	6 :	14

3.5 Einfluß der LH-RH-Stimulation auf die Biokonversion von ^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T (L-Behandlung)

Betrachtet man zunächst die Umsetzung der beiden Ausgangssubstrate, so sieht man, daß gegenüber der Kontrollgruppe durch die LH-RH-Stimulation außer bei den 5o Tage alten Ratten mehr Substrat metabolisiert wurde. Der altersabhängige Höchstumsatz liegt wiederum bei den 35 Tage alten Tieren (s. Tab. 13, vgl. dazu 3.2 Anmerkungen).

Tab. 13: Prozentsatz des metabolisierten Ausgangssubstrats unter verschiedenartiger Stimulation (L-, S-, SS-Behandlung) nach einstündiger Inkubation des Hodenhomogenats, N-Behandlung = Ergebnisse der Kontrollgruppe.

Rattenalter:		2o d	35 d	5o d	9o d	
von 1oo % metabolisiert (in %)	^{3}H-Δ-4	65,25	91,87	9o,21	81,28	N-Behandlung
		81,87	93,o5	88,35	88,95	L- "
		87,16	87,65	88,o3	86,51	S- "
		69,58	94,o4	89,72	83,48	SS- "
	^{14}C-T	27,28	75,93	49,93	29,o2	N-Behandlung
		36,o3	84,9o	46,88	24,21	L- "
		54,2o	69,o6	46,35	21,66	S- "
		35,74	9o,92	48,11	27,o2	SS- "

Vergleicht man direkt die 5α-Reduzierung der beiden Substrate, so läßt sich hier, deutlicher als in der Kontrollgruppe, die nahezu gleiche Metabolisierung von ^{3}H-T und ^{14}C-T zu DIOL und DHT erkennen (s. Tab. 14).

Tab. 14: Verhältnis von T : DHT : DIOL (gerundete Werte der wiedergefundenen prozentualen Radioaktivität) in den verschiedenen Altersstufen der mit LH-RH behandelten Tiere nach einstündiger Inkubation des Hodenhomogenats mit ^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T.

Rattenalter:	^{3}H-T :	^{3}H-DHT :	^{3}H-DIOL		^{14}C-T :	^{14}C-DHT :	^{14}C-DIOL
9o d	7o :	o,6 :	4,5	≈	76 :	o,6 :	4,o
5o d	5o :	5 :	23	≈	53 :	5 :	22
35 d	15 :	11 :	47	≈	15 :	11 :	64
2o d	49 :	7 :	14	≈	64 :	8 :	2o

3.5.1 Bildung von DHT

Siehe Tab. 7 bis 1o und Abb. 14 bis 17

Die LH-RH-Stimulation ergibt in allen Altersstufen verglichen mit der Kontrollgruppe etwas höhere ^{3}H-DHT-Werte, jedoch auf dem gleichen statistischen Signifikanzniveau. Die ^{14}C-DHT-Werte liegen bei den 2o und 9o Tage alten Tieren über den Werten der Kontrollgruppe und bei den 35 und 5o Tage alten Tieren darunter; jedoch sind die Unterschiede ebenfalls nicht statistisch signifikant.
Vergleicht man die ^{3}H-DHT-Ergebnisse der L-Behandlung zwischen den einzelnen Altersstufen, dann weisen die 35 Tage alten Ratten den statistisch signifikant höchsten Wert mit 1o,76% auf, gefolgt von den 2o und 5o Tage alten Ratten mit 6,58% und 4,47% (Werte sind voneinander nicht statistisch signifikant unterschiedlich), während die 9o Tage alten Tiere das signifikant niedrigste Ergebnis mit o,58% zeigen. Die ^{14}C-DHT-Werte decken sich sowohl vom Absolutwert her, als auch von der Verteilung in den verschiedenen Altersstufen her mit den ^{3}H-DHT-Werten; lediglich zwischen dem ^{14}C-DHT-Wert der 2o und dem der 35 Tage alten Ratten besteht kein signifikanter Unterschied mehr.

3.5.2 Bildung von DIOL

Siehe Tab. 7 bis 1o und Abb. 18 bis 21.

Durch die LH-RH-Vorbehandlung findet sich bei den 2o, 35 und 9o Tage alten Ratten, verglichen mit der Kontrollgruppe, mehr ^{3}H- und mehr ^{14}C-DIOL wieder, wobei die DIOL-Werte der 35-tägigen Tiere am deutlichsten (das 4- bis 5-fache des $s_{\bar{x}}$) über denen der Kontrolltiere liegen. Bei den 5o Tage alten Versuchstieren bleibt das wiederentdeckte ^{3}H- und ^{14}C-DIOL unter den Kontrollwerten. Zur Berechnung eines statistisch gesicherten Unterschieds konnte der SCHEFFE-Test nicht herangezogen werden.
Stellt man die DIOL-Werte in den einzelnen Altersgruppen einander gegenüber, sieht man, daß die 35 Tage alten Ratten signifikant am meisten DIOL bilden (47,25% ^{3}H-DIOL und 64,43% ^{14}C-DIOL), gefolgt von den 5o-tägigen Tieren (22,98% ^{3}H-DIOL und 22,35% ^{14}C-DIOL). Darunter - jedoch auf dem selben Signifikanzniveau - liegen die DIOL-Werte der 2o Tage alten Tiere (14,33% ^{3}H-DIOL und 19,7o% ^{14}C-DIOL). Das wenigste DIOL weisen die 9o Tage alten Ratten auf, signifikant am wenigsten ^{14}C-DIOL mit 3,98%, während das ^{3}H-DIOL mit 4,46% sich nicht signifikant vom ^{3}H-DIOL der 2o Tage alten Tiere unterscheidet.

3.5.3 Bildung 5α-reduzierter Metabolite

Siehe Tab. 7 bis 1o und Abb. 22 bis 25.

Die LH-RH-Stimulation ändert gegenüber den Ergebnissen der Kontrollgruppe am Verteilungsmuster der 5α-reduzierten Metabolite nichts: man findet in allen Altersstufen prozentual am meisten das DIOL, dann das DHT (1/2 bis 1/1o des DIOL) und dann das A-steron, welches etwas weniger als das DHT gefunden wird (Ausnahme bei den 35 Tage alten Ratten; hier liegt das ^{3}H-A-steron gering über dem ^{3}H-DHT). DION taucht in sehr kleinen Mengen auf, weshalb es bei der Summenbildung zur statistischen Auswertung nicht miteinbezogen wurde.

Bildet man die Summe aus DIOL, DHT und A-steron,nach

Nayfeh (43) das Maß für die 5α-Redukataseaktivität, und überträgt sie in das Schaubild, so gleicht der Kurvenverlauf dem des DHT bzw. DIOL: bei den 2o, 35 und 9o Tage alten Tieren liegt diese Summe sowohl bei den ^{3}H- als auch ^{14}C-5α-reduzierten Metaboliten über der Summe der Kontrolltiere, am augenfälligsten wiederum bei den 35 Tage alten Tieren. Die Summe der 5o Tage alten Tiere liegt wenig unter der Summe der Kontrolltiere.
Zwischen den einzelnen Altersstufen weist die Summe der ^{3}H- und ^{14}C-5α-reduzierten Metabolite wieder statistisch signifikante Unterschiede auf. Die signifikant höchste Summe haben die 35 Tage alten Tiere (72,69% ^{3}H- und 79,95% ^{14}C-5α- red. M.) gefolgt von den 5o Tage alten (31,21% ^{3}H- und 31,57% ^{14}C-5α-red. M.) und den 2o Tage alten Ratten (25,63% ^{3}H- und 28,58% ^{14}C-5α-red. M.), deren Summe sich nicht signifikant unterscheidet; die Summe der 9o Tage alten Ratten liegt signifikant am niedrigsten (5,55% ^{3}H- und 5,1o% ^{14}C-5α-red. M.).

3.6 Einfluß der superaktiven LH-RH-Stimulation in der Konzentration o,o4 µg/1oog KG auf die Biokonversion von ^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T (S-Behandlung)

Die S-Behandlung bewirkt in allen 4 Altersstufen eine fast gleich hohe Verstoffwechselung des ^{3}H-Δ-4, während das ^{14}C-T am meisten von den 35 Tage alten und am wenigsten von den 9o Tage alten Ratten metabolisiert wird (s. Tab. 13). Gegenüber der Kontrollgruppe setzt die S-Gruppe deutlich mehr ^{3}H-Δ-4 bei den 2o und 9o Tage alten Tieren um, jedoch bei den 35 und 5o Tage alten Tieren etwas weniger. Die Umsetzung von ^{3}H-Δ-4 der S-Gruppe liegt in der Größenordnung der L-Gruppe. ^{14}C-T wird in der S-Gruppe, verglichen mit der N-Gruppe, mit Ausnahme der 2o Tage alten Ratten weniger stark metabolisiert; diese Metabolisierung der S-Gruppe ist, verglichen mit der L-Gruppe, bei den 5o und 9o Tage alten Tieren in deren Größenordnung, bei den 2o Tage alten Ratten mehr und bei den 35 Tage alten weniger (s. Tab. 13).

Der direkte Vergleich in der 5α-Reduzierung beider Substrate läßt erneut die annähernd gleiche Verstoffwechslung zu DHT und DIOL erkennen.

Tab. 15: Verhältnis von T : DHT : DIOL (gerundete Werte der wiedergefundenen prozentualen Radioaktivität) in den verschiedenen Altersstufen der mit superaktivem LH-RH o,o4µg/1oog KG behandelten Tiere nach einstündiger Inkubation des Hodenhomogenats mit ^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T.

Rattenalter	^{3}H-T :	^{3}H-DHT :	^{3}H-DIOL	^{14}C-T :	^{14}C-DHT :	^{14}C-DIOL
9o d	71 :	o,7 :	2 ≃	78 :	o,7 :	2
5o d	51 :	8 :	2o ≃	54 :	9 :	18
35 d	28 :	9 :	34 ≈	3o :	12 :	47
2o d	37 :	12 :	21 ≈	46 :	15 :	3o

3.6.1 Bildung von DHT

Siehe Tab. 7 bis 1o und Abb. 14 bis 17

Die superaktive LH-RH-Stimulation o,o4 µg/1oog KG zeigt in allen Altersstufen im Vergleich zur Kontrollgruppe höhere ^{3}H-DHT-Werte, signifikant höher, aber nur bei den 2o und 5o Tage alten Tieren. Höher liegt das ^{3}H-DHT, verglichen mit der L-Gruppe, bei den 2o, 5o (hier signifikant) und 9o Tage alten Ratten, und nur bei den 35-tägigen Tieren liegt es nicht signifikant darunter. Das ^{14}C-DHT der S-Gruppe liegt in allen Altersstufen sowohl über den Werten der Kontrollgruppe als auch über denen der L-Gruppe, allerdings statistisch signifikant nur bei den 2o-tägigen Ratten.

Stellt man die ^{3}H-DHT-Ergebnisse der S-Behandlung in den einzelnen Altersgruppen nebeneinander, haben die 2o Tage alten Ratten den höchsten Wert mit 12,oo% inne, nicht signifikant unterschiedlich gefolgt von den 35 Tage alten Tieren mit 9,35%. Den dritthöchsten Wert weisen die 5o-tägigen Versuchstiere auf (7,68%, gleiches Signifikanzniveau mit den 35-tägigen, aber signifikant unterschiedlich zu den 2o-tägigen). Der signifikant niedrigste Wert von o,72% ist bei den 9o-tägigen Versuchstieren zu finden. Die statistische Verteilung

in den jeweiligen Altersstufen zeigen die ^{14}C-DHT-Werte.

3.6.2 Bildung von DIOL

Siehe Tab. 7 bis 1o und Abb. 18 bis 21

^{3}H-DIOL wird in der S-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe bei den 2o Tage alten Tieren doppelt so hoch angetroffen, jedoch liegen die Ergebnisse der 35, 5o und 9o Tage alten Tiere deutlich unter denen der Kontrollgruppe. Dasselbe Verhältnis zur Kontrollgruppe zeigen die ^{14}C-DIOL-Ergebnisse. Stellt man die ^{3}H-DIOL-Werte der S-Behandlung denen der L-Behandlung gegenüber, erkennt man, daß erstere bei den 2o Tage alten Ratten klar das höhere ^{3}H-DIOL hervorruft, aber bei den 35, 5o und 9o Tage alten Tieren sichtbar weniger ^{3}H-DIOL bilden läßt. Das gleiche gilt für die ^{14}C-DIOL-Ergebnisse. Der SCHEFFE-Test konnte zur Signifikanzberechnung nicht angewandt werden.
Analysiert man den Altersstufeneffekt in der S-Gruppe, so ergibt sich, daß wiederum die 35-tägigen Tiere klar am meisten ^{3}H-DIOL (34,o8%) bilden, aber nicht signifikant mehr als die 2o-tägigen (21,36%) und 5o-tägigen Tiere (2o,12%). Die ältesten Tiere erzeugen signifikant das wenigste ^{3}H-DIOL (2,o1%). Das meiste ^{14}C-DIOL findet sich wieder bei den 35 Tage alten Ratten (46,59%), nicht signifikant weniger findet man bei den 2o Tage alten Ratten (3o,2o%), zu den letztgenannten auf dem gleichen Signifikanzniveau liegt das ^{14}C-DIOL der 5o Tage alten Ratten (18,46%), das sich signifikant vom ^{14}C-DIOL der 35 Tage alten Ratten, aber nicht signifikant von dem der 9o-tägigen Tiere (2,o6%) unterscheidet.

3.6.3 Bildung 5α-reduzierter Metabolite

Siehe Tab. 7 bis 1o und Abb. 22 bis 25

Durch die S-Stimulation erhält man, verglichen mit der Kontrollgruppe, dasselbe Verteilungsbild der 5α-reduzierten Metabolite: stets wird in allererster Linie das DIOL ange-

troffen, danach mit Abstand das DHT und dann das A-steron (Ausnahme ^{3}H-A-steron der 35-tägigen Ratten). Prozentual in sehr geringen Mengen erscheint das DION und wird daher bei der Summenbildung nicht berücksichtigt.
Ein Behandlungseffekt läßt sich mit der Varianzanalyse für die Summe aus DIOL, DHT und A-steron nicht nachweisen (s. Tab. 6). In der S-Gruppe liegt die Summe der ^{3}H-5α-reduzierten Metabolite bei den 2o-tägigen Ratten klar über der Summe der Kontrolltiere, bei den 35-, 5o- und 9o-tägigen Tieren dagegen liegt sie wenig darunter. Die Summe der ^{14}C-5α-reduzierten Metabolite der S-Gruppe zeigt im Vergleich zur N-Gruppe dasselbe Verhalten wie die Summe der ^{3}H-5α-reduzierten Metabolite.
Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Altersstufen ergeben sich auch bei den Summen der ^{3}H- und ^{14}C-5α-reduzierten Metabolite: Die höchste Summe haben wieder die 35-tägigen Tiere (53,83% ^{3}H- und 62,59% ^{14}C-5α-red. Metabolite). Nicht signifikant darunter liegt die Summe der 2o-tägigen Ratten (41,72% ^{3}H- und 46,89% ^{14}C-5α-red. Metabolite). Die Summe der 5o Tage alten Tiere (3o,19% ^{3}H- und 3o,91% ^{14}C-5α-red. M.) besitzt dasselbe Signifiaknzniveau wie die der 2o Tage alten Tiere, sie unterscheidet sich aber signifikant von der Summe der 35 Tage alten Tiere. Bei den 9o-tägigen Versuchstieren findet sich die signifikant niedrigste Summe (3,29% ^{3}H- und 3,21% ^{14}C-5α-red. M.) wieder.

3.7 Einfluß der superaktiven LH-RH-Stimulation in der Konzentration o,4 µg/1oog KG auf die Biokonversion von ^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T (SS-Behandlung)

Wie aus Tab. 13 hervorgeht bewirkt die SS-Behandlung gegenüber der Kontrollgruppe eine geringgradig höhere Metabolisierung von ^{3}H-Δ-4, während ^{14}C-T, verglichen mit der Kontrollgruppe, bei den 2o- und 35-tägigen Ratten deutlich stärker und bei den 5o- und 9o-tägigen Tieren etwas geringer verstoffwechselt wird.
Im Vergleich zur S-Gruppe verringert die SS-Stimulation die

Umsetzung von ^{3}H-Δ-4 bei den 2o und 9o Tage alten Tieren, während sie bei den 35 und 5o Tage alten Ratten diese Umsetzung mäßig erhöht. Die Metabolisierung des ^{14}C-T der SS-Gruppe liegt bei den 2o-tägigen Ratten unter der der SS-Gruppe und bei den 35-, 5o- und 9o-tägigen darüber.

Stellt man die 5α-Reduzierung der beiden Ausgangssubstrate nebeneinander, so findet sich außer bei den 2o Tage alten Ratten wieder die annähernd gleiche Metabolisierung zu DHT und DIOL:

Tab. 16: Verhältnis von T : DHT : DIOL (gerundete Werte der wiedergefundenen prozentualen Radioaktivität) in den verschiedenen Altersstufen der mit superaktivem LH-RH o,4 µg/1oog KG behandelten Tiere nach einstündiger Inkubation des Hodenhomogenats mit ^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T.

Rattenalter:	^{3}H-T	:	^{3}H-DHT	:	^{3}H-DIOL		^{14}C-T	:	^{14}C-DHT	:	^{14}C-DIOL
9o d	65	:	o,7	:	1,9	≈	73	:	o,7	:	1,9
5o d	49	:	5	:	26	≈	52	:	6	:	25
35 d	1o	:	5o	:	15	≈	9	:	66	:	16
2o d	38	:	1o	:	12	≈	64	:	1o	:	2o

3.7.1 Bildung von DHT

Siehe Tab. 7 bis 1o und Abb. 14 bis 17

Durch die superaktive LH-RH-Stimulation o,4 µg/1oog KG wird in allen Altersstufen, gemessen an der Kontrollgruppe, sowohl ein höheres ^{3}H-DHT als auch ^{14}C-DHT gefunden, signifikant höher ist aber lediglich das ^{3}H-DHT bei den 2o und 35 Tage alten Ratten.

Im Vergleich zur L-Gruppe zeigen die Ratten mit der SS-Behandlung stets - jedoch nicht signifikant - mehr ^{3}H-DHT und mehr ^{14}C-DHT. Gegenüber der S-Stimulation ergibt sich durch die SS-Stimualtion nicht signifikant weniger ^{3}H-DHT und ^{14}C-DHT bei den 2o, 5o und 9o Tage alten Tieren, jedoch mehr ^{14}C-DHT und signifikant mehr ^{3}H-DHT bei den 35 Tage alten Tieren.

Blickt man auf den Altersstufeneffekt der SS-Behandlung, erkennt man, daß die 35-tägigen Ratten am meisten ^{3}H-DHT

(14,66%) und die 2o-tägigen nicht signifikant weniger ^{3}H-DHT (1o,46%) bilden, während die 5o-tägigen zu den zuvorgenannten Altersgruppen signifikant weniger ^{3}H-DHT (5,o9%) erzeugen. Das ^{3}H-DHT der 9o Tage alten Tiere (o,65%) unterscheidet sich nicht signifikant von dem der 5o Tage alten. Das höchste ^{14}C-DHT (16,oo%) ist bei den 35 Tage alten Ratten zu finden, gefolgt von den sich nicht signifikant unterscheidenden Werten der 2o und 5o Tage alten Ratten (9,87% und 6,48%) und schließlich gefolgt von dem signifikant niedrigsten ^{14}C-DHT der 9o Tage alten Tiere (o,67%).

3.7.2 Bildung von DIOL

Siehe Tab. 7 bis 1o und Abb. 18 bis 21

Im Vergleich zur Kontrollgruppe liegt die wiedergefundene Radioaktivität des ^{3}H- und ^{14}C-DIOL der SS-Gruppe bei den 2o und 35 Tage alten Ratten deutlich über den Kontrollwerten und bei den 5o und 9o Tage alten darunter. Gemessen mit der S-Gruppe erweisen sich sowohl die ^{3}H- und die ^{14}C-DIOL-Werte der SS-Gruppe bei den 2o, 35 und 5o Tage alten Ratten als sichtlich höher, dagegen bei den 9o Tage alten Tieren als geringfügig niedriger. Ein Behandlungseffekt für die Bildung von DIOL kann mit der Varianzanalyse nicht gesichert werden.

Wird die Bildung des DIOL in den einzelnen Altersstufen einander gegenübergestellt ergibt sich, daß die 35 Tage alten signifikant am meisten ^{3}H- und ^{14}C-DIOL (49,92% und 65,55%) erzeugen. Den zweiten Rang beim ^{3}H-DIOL nehmen mit signifikantem Unterschied die 5o-tägigen Ratten (25,91%) ein, gefolgt von den 2o- und 9o-tägigen Ratten, die sich nicht signifikant unterscheiden (11,55% und 1,9o%). An zweiter Stelle beim ^{14}C-DIOL kommen ebenfalls die 5o-tägigen Tiere (25,o9%), gefolgt von den auf dem gleichen Signifikanzniveau liegenden 2o-tägigen (21,o2%), danach mit signifikantem Unterschied gefolgt von den 9o-tägigen Tieren(1,94%).

3.7.3 Bildung 5α-reduzierter Metabolite

Siehe Tab. 7 bis 1o und Abb. 22 bis 25

Auch die SS-Behandlung weist dasselbe Verteilungsmuster der 5α-reduzierten Metabolite auf wie die zuvor erwähnten Behandlungsarten: als Hauptmetabolit findet sich mit großem Abstand das DIOL, dann das DHT (1/3 bis 1/5 des DIOL), und danach das A-steron. Das DION wird in Spuren wiedergefunden und deshalb nicht in die statistische Auswertung miteinbezogen.

Vergelicht man die Summe aus DIOL, DHT und A-steron der SS-Gruppe mit der Kontrollgruppe, so sieht man, daß bei den 2o- und 35-tägigen Ratten die ^{3}H- und ^{14}C-Summe evident über der Summe der Kontrollwerte liegt und bei den 5o- und 9o-tägigen wenig darunter. Absolut gesehen wird bei den 35 Tage alten Ratten durch die SS-Stimulation die höchste Summe der 5α-reduzierten Metabolite überhaupt erzielt: 78,16% ^{3}H- und 86,33% ^{14}C-5α-reduzierte Metabolite. Gemessen an der S-Stimulation hat die SS-Stimulation bei den 35- und 5o-tägigen Tieren die klar größere Summe von ^{3}H- und ^{14}C-5α-reduzierten Metabolite zur Folge, bei den 2o-tägigen die deutlich kleinere und bei den 9o-tägigen Tieren praktisch dieselbe Summe. Die Varianzanalyse zeigt keinen statistisch signifikanten Behandlungsefffekt.
Zwischen den einzelnen Altersstufen weist die Summe der ^{3}H- und ^{14}C-5α-reduzierten Metabolite wieder statistisch signifikante Differenzen auf: die signifikant höchste Summe haben die 35 Tage alten Tiere (Werte s. o.), danach kommen die 5o Tage alten (43,55% ^{3}H- und 35,o4% ^{14}C-5α-reduzierter Metabolite) und auf der gleichen Signifikanzebene die 2o Tage alten Tiere (24,4o% ^{3}H- und 31,11% ^{14}C-5α-red. M.), die signifikant geringste Summe ist bei den 9o Tage alten Ratten (3,18% ^{3}H- und 3,17% ^{14}C-5α-red. M.) zu finden.

3.8 Biokonversion von ^{3}H-Δ-4 zu ^{3}H-T unter dem Einfluß der verschiedenen Stimulationen

Siehe Tab. 1o und Abb. 25 und 26

Das wiedergefundene ^{3}H-T im Experiment hängt zum einen ab von der Wirkung der 17ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase, sprich wieviel ^{3}H-Δ-4 gemäß dem hauptsächlichen Stoffwechselweg überhaupt zum T metabolisiert wird (als grobes Maß hierfür kann der Prozentsatz des metabolisierten ^{3}H-Δ-4, s. Tab. 13, angesehen werden), und hängt zum andern ab von der Wirkung der 5α-Reduktase, sprich wieviel des gebildeten ^{3}H-T sogleich weiter zu DHT und Folgeprodukten reduziert wird.

Verglichen mit der Kontrollgruppe liegt das ^{3}H-T der L-Behandlung bei den 2o Tage alten Tieren mit 49,36% um fast 1o% höher. Bei den 35 Tage alten Ratten liegt es mit 15,4o% um etwa 7% niedriger als bei der Kontrollgruppe; bei den 5o und 9o Tage alten und mit LH-RH behandelten Tieren steht das ^{3}H-T mit 5o,65% und 7o% um rund 4% über dem Kontrollwert.

Die S-Stimulation führt bei den 2o-tägigen Ratten zu einem etwas geringeren ^{3}H-T (37,4o%) als bei den Kontrollratten, jedoch führt sie bei den 35-tägigen Ratten (27,78%), den 5o-tägigen (51,11%) und den 9o-tägigen (71,24%) stets zu rund 5% mehr ^{3}H-T. Wird die S-Behandlung mit der L-Behandlung verglichen, so sieht man, daß der ^{3}H-T-Wert der S-Gruppe bei den 2o Tage alten Tieren evident unter und bei den 35 Tage alten sichtbar über dem Wert der L-Gruppe steht, während S- und L-Wert bei den älteren Altersstufen sich praktisch entsprechen.

Gemessen an der Kontrollbehandlung wird durch die SS-Behandlung bei den 2o-, 5o- und 9o-tägigen Ratten mit 38,4o%, 48,7o% und 64,67% ein beinahe gleich hohes ^{3}H-T erzielt. Nur die 35-tägigen Ratten mit 9,52%, dem absolut niedrigsten Prozentsatz für ^{3}H-T, liegen deutlich unter dem Kontrollwert. Gegenüber der S-Behandlung weist die SS-Behandlung bei den 2o- und 5o-tägigen Versuchstieren ein ^{3}H-T der gleichen Größenordnung auf, bei den 35- und 9o-tägigen liegt es eindeutig unter dem Wert der S-Gruppe.

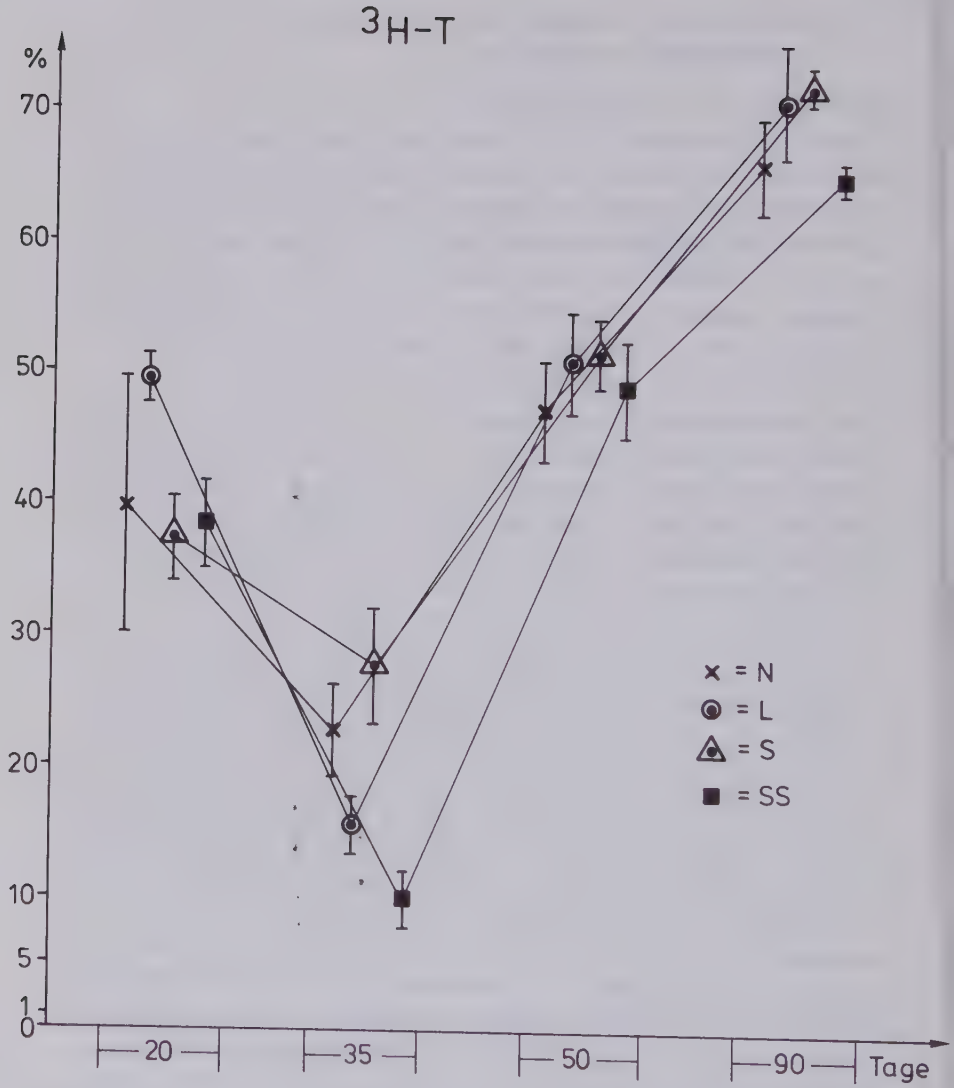


Abb. 26: Darstellung der wiedergefundenen Radioaktivität in % von ^{3}H-T in den vier Altersstufen nach Inkubation des Hodenhomogenats mit ^{3}H-Δ-4.

Aufzeichnung des Behandlungseffekts, Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = superaktives LH-RH o,o4 µg/1oog KG, SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG.
Die senkrechten Striche geben $s_{\bar{x}}$ an. Die varianzanalytische Prüfung der Werte konnte keinen signifikanten Behandlungseffekt nachweisen.

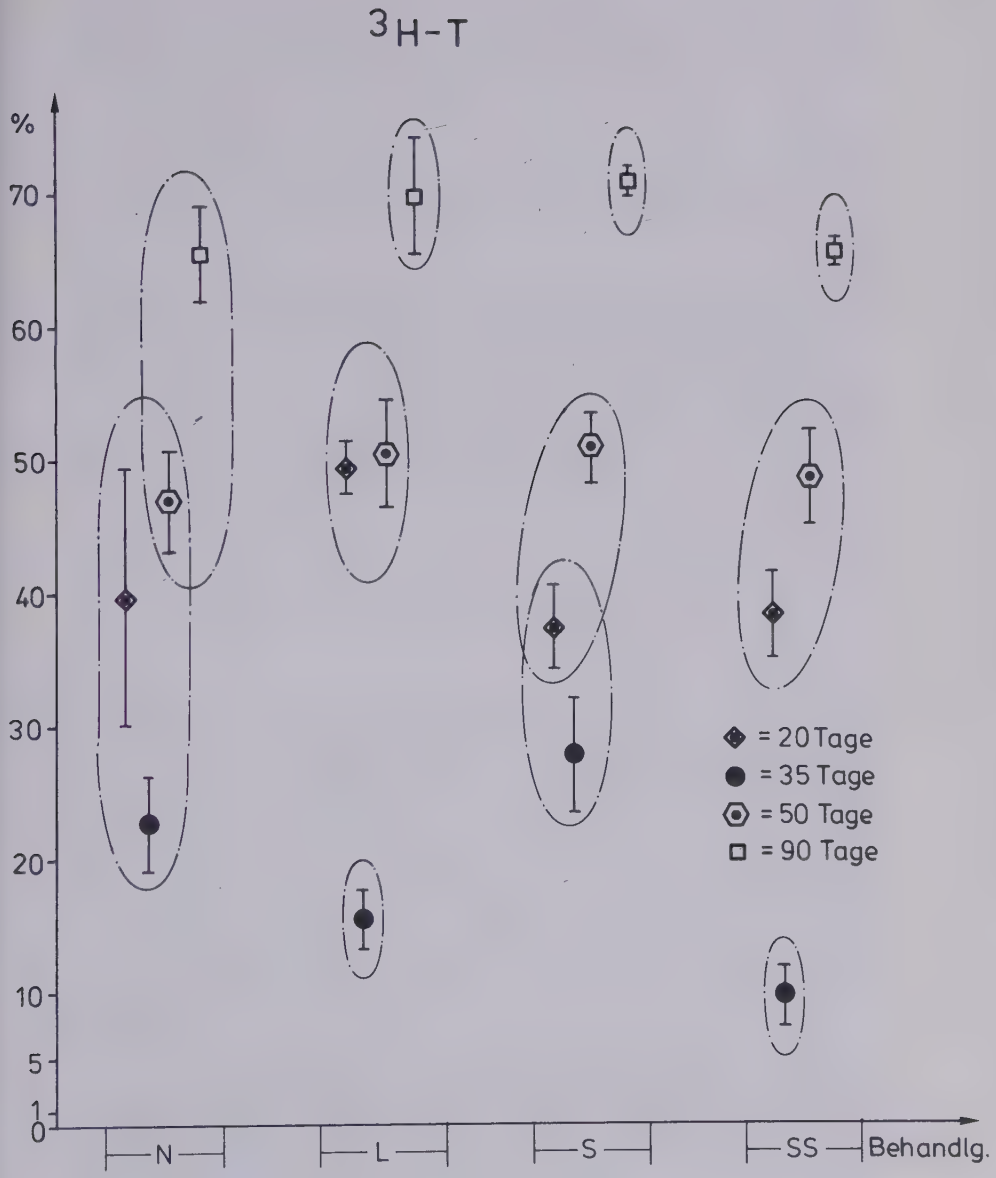


Abb. 27: ^{3}H-T-Werte nach Behandlungsart gruppiert, Darstellung des Alters-stufeneffekts. Nähere Angaben siehe Legende der Abb. 26 und 14

Statistisch signifikante Unterschiede ergeben sich bei der Analyse des Altersstufeneffekts. Innerhalb der Kontrollgruppe zeigen die ältesten Tiere das signifikant höchste ^{3}H-T, mit klarem aber nicht signifikantem Abstand, gefolgt von den 5o-tägigen Tieren, deren Wert das gleiche Signifikanzniveau wie die 2o- und 35-tägigen Tiere hat; die Werte der letztgenannten Ratten sind signifikant niedriger als die der 9o-tägigen Ratten.
Bei der L-Gruppe sind die Unterschiede deutlicher: das signifikant größte ^{3}H-T ist bei den 9o Tage alten Ratten zu finden, den zweiten Rang nehmen die sich nicht in ihren Werten signifikant unterscheidenden 5o und 2o Tage alten Ratten ein; das signifikant kleinste ^{3}H-T haben die 35 Tage alten Tiere.

Blickt man auf den Altersstufeneffekt in der S-Gruppe, so läßt sich ablesen, daß bei den ältesten Tieren das signifikant höchste ^{3}H-T anzutreffen ist, daß bei den 5o-tägigen Tieren ohne Signifikanz mehr als bei den 2o-tägigen wiedergefunden wird und daß bei den 35-tägigen Tieren das geringste ^{3}H-T bestimmt wird, signifikant weniger, aber nur gegenüber den 5o- und 9o-tägigen Tieren.
In der SS-Gruppe zeigen die 9o Tage alten Ratten das signifikant meiste und die 35 Tage alten das signifikant geringste ^{3}H-T, dazwischenstehend weisen die 5o Tage alten Ratten nicht signifikant mehr ^{3}H-T auf als die 2o Tage alten Versuchstiere.

Zusammenfassend ergibt sich für die Biokonversion des ^{3}H-Δ-4 zu ^{3}H-T ein nachweisbarer aber nicht statistisch gesicherter Behandlungseffekt. Signifikante Unterschiede finden sich zwischen den einzelnen Altersstufen, wobei die Rangfolge für das meist gefundene ^{3}H-T von den 9o Tage alten Ratten über die 5o Tage alten hin zu den 2o und 35 Tage alten geht. Die Menge an wiedergefundenem ^{3}H-T wird wahrscheinlich mehr durch die Aktivität der 5α-Reduktase als durch die der 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase bestimmt. Dafür spricht, daß die Prozentwerte des metabolisierten ^{3}H-Δ-4 (s. Tab. 13) zwischen 65,25% und 94,o4% schwanken, gegenüber 9,52% und 71,24% des wiedergefundenen ^{3}H-T; außerdem liegt der Altersgipfel für das

metabolisierte ^{3}H-Δ-4 bei den 35-tägigen Ratten, die Altersstufe, in der sich das Minimum des ^{3}H-T und das Maximum der 5α-reduzierten Metabolite befindet.

3.9 Verhältnis von Androstendion und Testosteron zu den 5α-reduzierten Metaboliten

Siehe Abb. 28

Um den Metabolismus von ^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T in seiner Gesamtheit zu beurteilen wird der Quotient (q) aus den ungesättigten, nicht reduzierten Ausgangssteroiden (wesentliche Wirkungsebene der 17β-Hydoxysteroid-Dehydrogenase) zur Summe der gesättigten, 5α-reduzierten Steroide (vorallem Ausdruck für die Wirkung der 5α-Reduktase) gebildet:

$$q = \frac{T + \Delta\text{-}4}{DHT + DIOL + A\text{-steron} + DION}$$

Aus der Größe von q kann sofort leicht abgelesen werden, ob eine hohe (q<1), gleichgroße (q=1) oder geringe (q>1) Biokonversion zu den 5α-reduzierten Steroiden vorliegt.

Stellt man zunächst einmal die Quotienten der ^{3}H- und ^{14}C-Steroide einander gegenüber, so läßt das Diagramm in allen Behandlungsarten einen fast parallelen Kurvenverlauf erkennen: bei den 2o, 35 und 5o Tage alten Ratten liegt das q der ^{3}H-Steroide stets minimal über dem q der ^{14}C-Steroide, und nur bei den 9o Tage alten Ratten ist die Beziehung genau umgekehrt.

Die verschiedenartige Stimulation der Versuchstiere führt in allen 4 Behandlungsgruppen zu einem ähnlichen altersabhängigen Verlauf. Bei den 2o-tägigen Tieren liegt das q der L-, S- und SS-Gruppe klar unter dem q der Kontrollgruppe und beträgt stets mehr als 1, jedoch ist das q der S-Gruppe, das kleinste in dieser Altersstufe, minimal größer als 1. Bei

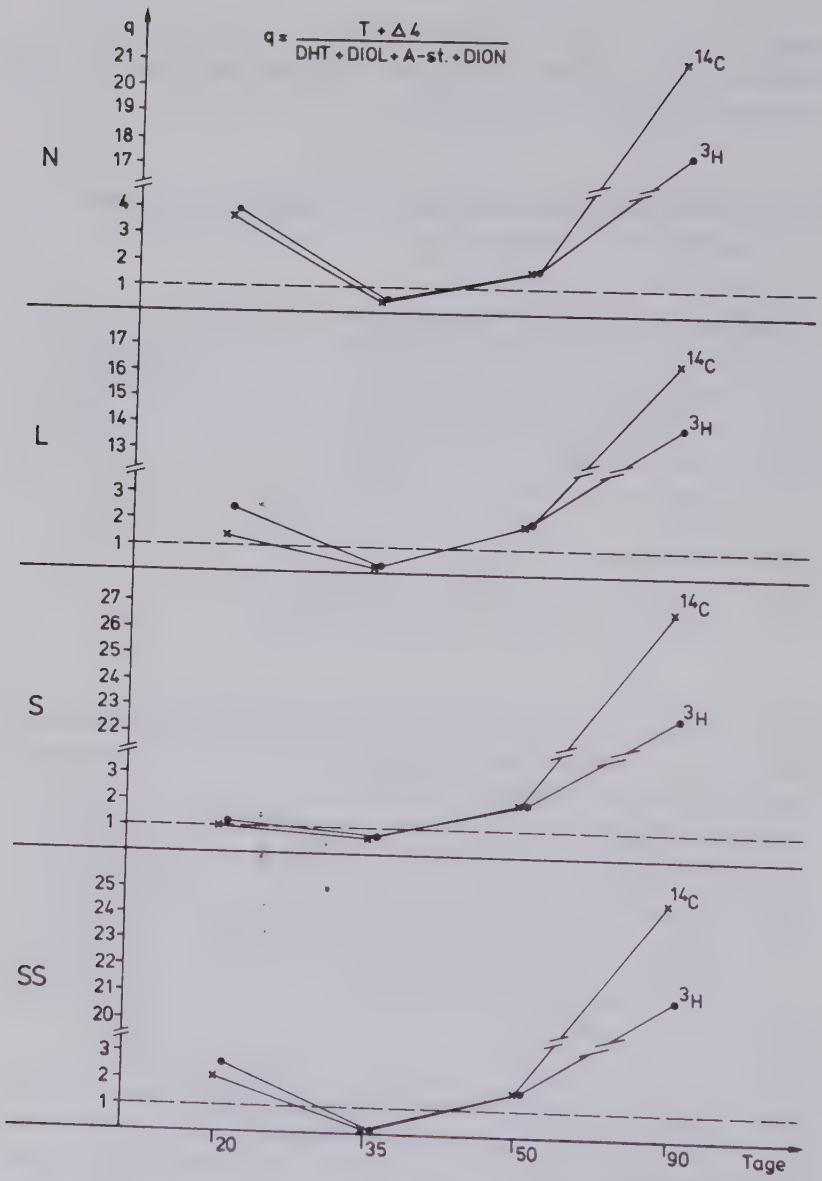


Abb. 28: Darstellung des Verhältnisses (q) der ungesättigten, nicht reduzierten Steroide T und Δ-4 zur Summe der gesättigten, 5α-reduzierten Steroide DHT, DIOL, A-steron und DION nach Inkubation des Hodenhomogenats in den verschiedenen Altersstufen mit ^{3}H-Δ-4 (im Diagramm: ^{3}H-Kurve) und ^{14}C-T (im Diagramm: ^{14}C-Kurve).

In allen 4 Behandlungsarten (Injektion von: N = NaCl o,9% (Kontrolle), L = LH-RH, S = superaktives LH-RH o,o4 µg/1oog KG, SS = superaktives LH-RH o,4 µg/1oog KG) zeichnet sich ein ähnlicher altersabhängiger Kurvenverlauf ab.

den 35-tägigen Ratten fällt auf, daß sämtliche q kleiner als 1 sind, daß die L-Stimulation zu einem halb so großen q als das der Kontrolle führt, die S-Stimulation zu einem gegenüber der Kontrolle mimimal größeren q, während die SS-Behandlung das absolut niedrigste q erzeugt. Die 5o Tage alten Ratten weisen ein q von knapp 2 auf, wobei die SS-, L- und S-Behandlung (Reihenfolge nach ansteigendem q) ein größeres q als das der Kontrolle hervorruft; d. h. in dieser Altersstufe bewirken die Releasing-Hormon-Stimulationen eine geringere Biokonversion zu den 5α-reduzierten Steroiden als die Kontrolle. Für die 9o-tägigen Versuchstiere ist ein q sehr viel größer als 1 (um 2o) kennzeichnend. Das q der L-Gruppe liegt in dieser Altersstufe unter dem Kontrollquotienten und das q der S- und SS-Gruppe deutlich darüber.

V DISKUSSION

Der Einfluß von LH-RH und des superaktiven Analogons Des-Gly^{10}-D-Ala^{6}-LH-RH-ethylamide auf den Metabolismus von Androstendion und Testosteron im Hodenhomogenat verschieden alter Ratten war Gegenstand der vorliegenden Studie. Gleichzeitig wurde der Serumspiegel von LH und FSH bestimmt. Untersucht wurden diese Auswirkungen 3o Minuten nach Gabe einer einmaligen Dosis der Releasing Hormone.

1. Diskussion der Ergebnisse der Serumgonadotropine

Die FSH-Werte der Kontrollgruppe zeigen den erwarteten altersabhängigen Verlauf, mit der höchsten Serumkonzentration bei den pubertierenden 35-tägigen Ratten, während die LH-Serumwerte ein altersabhängiges Maximum vermissen lassen und von der jüngsten bis zur ältesten Altersgruppe langsam ansteigen. Gupta und Mitarbeiter (21,23) fanden bei den gleichen Versuchstieren (tägliche bestimmung von LH und FSH vom 16. bis 4o. Lebenstag und danach zehntägliche Bestimmung bis zum 9o. Lebenstag) ein LH-Maximum am 5o. Tag, sowie einen FSH-Gipfel am 33. Lebenstag. Miyachi (4o) konnte bei seiner Untersuchung heranreifender männlicher Ratten einen LH-Peak im Serum um den 2o. Lebenstag und einen FSH-Peak am 35. Tag nachweisen. Die Absolutwerte für LH liegen bei gleicher Referenzpräparation (NIAMDD-Rat-LH bzw. -FSH-RP1) in der gleichen Größenordnung, differieren aber beim FSH zum Teil beträchtlich: so beträgt die FSH-Konzentration der 2o Tage alten Ratten bei Gupta 35o µg/ml, bei Miyachi 6oo resp. 5oo µg/ml und im Experiment bei der Kontrollgruppe 6 µg/ml; die der 35 Tage alten Ratten bei Gupta 6oo µg/ml, bei Miyachi 35o resp. 65o µg/ml und vorliegend 37o µg/ml (s. unten Tab. 17).

Der durch die Stimulation mit den Releasing Hormonen erzeugte Anstieg des LH und FSH im Serum ist abhängig von der applizierten Stimulationsdosis und vom Zeitpunkt der Bestimmung des Serumspiegels nach der Gabe.

Gupta und Eichner (24) sehen schon 1o Minuten nach LH-RH-i.v.-Gabe (o,4 µg/1oog KG) den maximalen LH- und FSH-Anstieg im Serum bei präpubertären Ratten, dagegen erst nach 3o Minuten bei den erwachsenen Ratten. Debeljuk (12) bestimmmte 15 Minuten nach i.v.-Stimulation mit o,5 µg LH-RH/1oog KG den Gonadotropinspiegel, Mijachi (4o) 3o Minuten nach i.p.-Verabreichung von o,2-2 µg LH-RH/1oog KG. Jetter (33) findet 3o bis 6o Minuten nach LH-RH-Gabe die Sekretionsmaxima von LH und FSH bei Kindern während der Pubertät. Bei Männern erhält Arimura (1) 15 bis 2o Minuten nach i.v.- und 3o Minuten nach s.c.-Injektion von 1oo µg LH-RH ähnliche LH- und FSH-Peaks im Serum. Daß LH-RH praktisch unabhängig von der Applikationsart (i.v., s.c., i.p., intracarotid, intravaginal, perkutan oder oral) LH im Serum ansteigen läßt, konnte Schally (58) bei Ratten nachweisen.

Cusan (11) untersuchte nach Gabe von LH-RH und superaktivem Analogon in steigender Dosierung stündlich die FSH- und LH-Serumkonzentration mittels einer tags zuvor gelegten Jugularis-kanüle. Er fand, daß LH-RH s.c. in der Dosierung 5-5oo ng/erwachsene Ratte einen LH- und FSH-Gipfel nach 1 Stunde hervorruft, während LH-RH mit 5-5o µg dosiert einen LH-Peak nach 2 Stunden und einen FSH-Peak nach 3 Stunden erzeugt. Außerdem stiegen bei ihm LH und FSH erst signifikant an, wenn mit mindestens 5oo ng LH-RH stimuliert wurde. Dosierungsunabhängig entdeckte er bei der des-Gly^{1o}-$D\text{-}Ala^{6}$-LH-RH-EA-Stimulation die höchsten LH-Werte nach 2 Stunden und die höchsten FSH-Werte nach 3 Stunden.

Die Angaben über die relative Potenz des des-Gly^{1o}-$D\text{-}Ala^{6}$-LH-RH-EA, verglichen mit LH-RH - bezogen auf die Dosierung, welche ein gleiches Ansteigen von FSH und LH im Plasma hervorruft - schwanken zum Teil beträchtlich. Nach Vale (66) besitzt das superaktive Analogon die 14-fache relative Potenz, nach Schally (58) die 1o- bis 2o-fache, laut Nair (42) ebenfalls die 2o-fache, während Coy (1o) es ca 3o-mal und Cusan (11) 1oo-mal so potent findet. Im Experiment konnte die gut 1o-fache Potenz bestätigt werden: verglichen mit der L-Gruppe (Gabe von LH-RH) zeigt die S-Gruppe (superaktives LH-RH zehn-

fach niedriger dosiert als LH-RH) in den jeweiligen Altersstufen den gleichen Anstieg von LH und einen noch höheren Anstieg von FSH.
Untenstehend sind in Tab. 17 einige ausgewählte LH- und FSH-Werte aus Arbeiten mit ähnlichen Bedingungen (männliche Ratten als Versuchstiere, entsprechende Dosierung von LH-RH bzw. superaktivem Analogon) zum direkten Vergleich zusammengefaßt.

2. Diskussion des Androgenmetabolismus

2.1 Bewertung der angewandten Methode

Die vorliegende in-vitro-Biokonversionstudie basiert auf der von Steinberger und Ficher sowie vielen anderen Autoren (62, 15, 16, 35,36,38,51,6o) angewandten Methode und auf den Erfahrungen vorausgegangener Arbeiten des Labors (26,45,49). Aussagen über den Metabolismus des inkubierten Steroids hängen ab von der in-vivo-Vorbehandlung, der Inkubation, der Extraktion und der chromatographischen Trennung.

ad in-vivo-Vorbehandlung:

Wesentliche Größen der in-vivo-Vorbehandlung sind die applizierte Hormondosis sowie die Zeitspanne zwischen Injektion und Dekapitation der Versuchstiere.
Wie schon in der Diskussion der Serumgonadotropine ausgeführt, erzeugt die gewählte Dosierung der Releasing Hormone ein signifikantes Ansteigen der Serumgonadotropine nach 3o Minuten. Der unmittelbare Effekt von LH und FSH auf die Steroidsynthese ist durch viele Arbeiten belegt (z. B.: 13,46,65). Inwieweit die Gonadotropine auch unmittelbar nach ihrer Verabreichung den Steroidabbau beeinflussen, gibt es kaum Hinweise in der Literatur. Folman et al. (16) untersuchten die Wirkung von LH, FSH und hCG auf den T-Metabolismus. Sie fanden, daß die direkte Zugabe der Gonadotropine ins Inkubationsmedium ohne Effekt war, daß jedoch die Gonadotropingabe 18 und 9 Stunden vor Dekapitation der Ratten die Produktion der 5α-reduzierten Metabolite beeinflußte. Nayfeh und Mitarbeiter (43)

Tab. 17: Gegenüberstellung ausgewählter FSH- und LH-Serumspiegel anderer Arbeiten mit den Ergebnissen des Experiments, Angaben in ng/ml

			Versuchsergebnisse		
	LH	FSH	LH	FSH	(Bhdlg.,Alter)
Gupta, Rager et al. (21,23):					
Plasmaprofil 16 bis 9o Tage	R.-alter: 2o d	45 35o	12	6	(N,2o)
alter Ratten	35 d	6o 61o	27	366	(N,35)
(NIAMDD-LH- bzw. -FSH-RP1)	5o d	18 35o	29	223	(N,5o)
	9o d	85 37o	38	1o5	(N,9o)
Swerdloff et al. (63):					
native Serumspiegel in 6 verschiedenen Altersstufen					
(NIAMDD-LH- bzw. -FSH-RP1)	R.-alter: 21 d	33 9oo	12	6	(N,2o)
	35 d	38 125o	27	366	(N,35)
	49 d	4o 8oo	29	223	(N,5o)
	91 d	5o 45o	38	1o5	(N,9o)
Root and Russ (55):					
native Serumspiegel	42 Tage alte Ratten:	4o 415	27	366	(N,35)
(NIAMDD-LH- bzw.-FSH-RP1)	erwachsene Ratten:	5o-6o 25o	38	1o5	(N,9o)
Gupta and Eichner (24):					
o,4 µg/1oog KG LH-RH i. v.	R.-alter: 16 d	21o 222	136	165	(L,2o)
Serumspiegel 3o min nach der	36 d	167 4o8	223	475	(L,35)
Gabe bei 5 versch. Altersstufen	56 d	225 358	237	363	(L,5o)
(NIAMDD-LH- bzw. -FSH-RP1)	9o d	253 46o	116	195	(L,9o)
Debeljuk et al. (12):					
o,5 µg/1oog KG LH-RH i. v.	R.-alter: 25 d	18o* 1ooo	136	165	(L,2o)
Serumspiegel 15 min nach Gabe	35 d	21o* 95o	223	475	(L,35)
(NIAMDD-FSH-RP1 u. NIH-LH-S14 ent-	45 d	21o* 75o	237	363	(L,5o)
spricht 3o x NIAMDD-LH-RP1;*=korrig.)	24o d	1oo* 4oo	116	195	(L,9o)
Miyachi et al. (4o):					
nur 2o Tage alte Ratten	Dosis: o,2 µg	1oo 6oo	136	165	(L,2o)
o,2 - 2,o µg/1oog KG LH-RH i. p.	1,o µg	7oo 11oo			
Serumspiegel 3o min nach Gabe	2,o µg	1o5o 13oo			
Cusan et al. (11):					
nur erwachs. R.; s.c.-Gabe von: L =	o,5 µg L	1oo 35o	116	195	(L,9o)
LH-RH u. A = des-Gly^{10}-D-Ala^{6}-LH-RH-EA	o,o5 µg A	22o 32o	137	237	(S,9o)
6o min postinj.,(NIAMDD-LH-/-FSH-RP1)	o,5 µg A	45o 42o	1o4	157	(SS,9o)

an 4 aufeinander folgenden Tagen erwachsene Ratten mit 5oo µg FSH bzw. 3oo µg LH, bevor sie die Inkubation zur Ermittlung der 5α-Reduktase-Aktivität starteten.
Wie die Releasing Hormone in ihrer direkten Wirkung auf das testikuläre Gewebe kurz nach der Applikation den T-Metabolismus beeinflussen, konnte aus der Literatur nicht entnommen werden.

ad Inkubation:

Abgesehen vom Inkubationsmedium - es wurde gegenüber früheren Arbeiten erkannt, daß NADP als Cofaktor essentiell für die 5α-Reduktase ist (12,17) und somit dem Medium zugesetzt werden muß - wird der Metabolismus im Inkubat im wesentlichen bestimmt durch die Menge des zu inkubierenden Substrats und der Menge bzw. dem Aktivitätszustand des angreifenden Enzymsystems. Hinzu kommt noch die Abhängigkeit von der Zeitdauer.

Shanies et al. (6o) inkubierten in einer Versuchsserie menschliche Fibroblastenkulturen mit ansteigender T-Konzentration und fanden dabei ein lineares Anwachsen ihrer 4 Hauptmetabolite (Δ-4, DHT, DIOL und A-steron); sie zogen daraus den Schluß, in einem nicht gesättigten Substrat-Enzym-Verhältnis gearbeitet zu haben, da weder ein Plateau noch ein Abfall in der Metabolitenkurve auftrat.
Nach Matsumoto and Yamada (38), die Tubuli seminiferi mit ^{3}H-T inkubierten, ist die Bildung 5α-reduzierter Metabolite ungefähr proportional zum Gewicht des zugegebenen Hodengewebes und sie schätzten, daß die tatsächlich gebildeten 5α-reduzierten Produkte größer als die wiedergefundenen Produkte sind, sobald mehr als 5o% des Substrats metabolisiert werden.

Die Untersuchungen von Lloret and Weisz (36) über den Testosteron-Metabolismus in Tubuli seminiferi erwachsener Ratten zeigen den Effekt zunehmender Substratkonzentration: mit steigender T-Konzentration (von o,33 bis 15 nmol/1oo mg Gewebe) steigt auch das gebildete DHT an, während das DIOL nur anfangs steigt und dann ein Plateau bildet; in niedriger Substratkonzentration wird also mehr DIOL als DHT angetroffen, dagegen in höherer Konzentration mehr DHT als DIOL. Sie führen diesen

Befund auf eine Aktivitätsminderung der 3α-Oxidoreduktase durch das T zurück.
Folman und Mitarbeiter (15,16) gingen in ihren Arbeiten über die in-vitro-Bildung von DHT und anderen 5α-reduzierten Produkten aus ^{3}H-T auch auf das Problem der Substratkonzentration ein. Zum einen inkubierten sie o,33 nMol ^{3}H-T mit steigender Konzentration von nicht radioaktivem T und fanden eine prozentuale Abnahme von gebildetem ^{3}H-DHT, obwohl die totale Menge an produziertem DHT zugenommen hatte. Zum anderen zeigten sie, daß durch Inkubation mit steigender Menge zerzupftem Hodengewebe bei der gegebenen ^{3}H-T-Konzentration die wiedergefundene Radioaktivität an T, DHT und DION abnahm, an DIOL jedoch konstant blieb.
Rivarola et al. (51,52) untersuchten den zeitlichen Verlauf der Bildung 5α-reduzierter Steroide nach halb- bis vierstündiger Inkubation bei 2o und 9o Tage alten Ratten. Bei den 9o-tägigen Ratten ermittelten sie ein stetiges Absinken des T bei stetigem Ansteigen des DIOL, während die gebildete Menge an DHT und Δ-4 praktisch konstant blieb. Bei den 2o-tägigen Tieren fanden sie innerhalb der ersten Stunde einen sehr steilen Abfall des T bei gleichzeitig steilem Anstieg des DIOL, danach zeigte T nur noch einen sehr flachen Abfall und das gebildete DIOL ein Plateau; die Bildung von DHT, Δ-4 und A-steron war stets gleich niedrig. Nach diesen Untersuchungen wurde also durch die einstündige Inkubationszeit im vorliegenden Experiment der wesentliche Metabolismus erfaßt.

In Voruntersuchungen über den Effekt steigender T-Konzentrationen auf die Umwandlung von DHT und DIOL kommen Nayfeh und Mitarbeiter (43) zu einem ähnlichen Ergebnis wie Lloret (36): DHT, der kleinere Metabolit in niedrigerer Substratkonzentration, wird in höherer Konzentration in fast gleicher Menge wie DIOL vorgefunden. Nayfeh wählt die Substratkonzentration von 17,3 µMol ^{3}H-T pro 1oo mg Hodengewebe, um damit eine annähernde Sättigung der 5α-Reduktase (K_M = 7,6 x $1o^{-6}$ Mol) zu gewährleisten, ohne dabei die 3α-Oxidoreduktase bedeutsam zu hemmen. Unter diesen Bedingungen wird DHT sofort zu DIOL umgewandelt, und das 5α-Reduktase-System ist der limitierende

Faktor der Bildungsrate.
Nayfehs Substratkonzentration von 17,3 µMol ^{3}H-T/1oo mg Gewebe weist gegenüber anderen Arbeiten eine fast 1ooo-fach höhere Konzentration auf: Folman (15,16) wählte o,33 nMol ^{3}H-T/2oo mg Gewebe, Lloret (36) o,33 nMol ^{3}H-T/1oo mg, Matsumoto (38) 5 nMol ^{3}H-T/1oo mg, Nübel (45) o,3 nMol ^{3}H-Pregn./g, Rager (49) o,2 µMol ^{3}H-Prog./1oo mg, Rivarola (51,52) 1,87 nMol ^{14}C-T/4oo mg und Steinberger (62) 3,7 nMol ^{3}H-Δ-4/5o mg sowie 4,42 nMol ^{3}H-T/5o mg. In der vorliegenden Arbeit wurde mit o,o83 nMol ^{3}H-Δ-4/g und 15 nMol ^{14}C-T/g entsprechend 23,8 ng ^{3}H-Δ-4 und 4326 ng ^{14}C-T inkubiert. Nach Nayfeh liegen somit alle oben aufgeführten Arbeiten nicht in einem für das 5α-Reduktase-System gesättigten Verhältnis.

Die testikuläre endogene T-Konzentration beträgt für erwachsene Ratten bei Carmichael et al. (9) ca 35 ng/g Hodengewebe, bei Lacroix und Mitarbeiter (35) 21 ng/g und bei Bourne et al. (5) ca 8o ng/Testis. Podesta und Rivarola (48) bestimmen pro Hoden bei verschieden alten Ratten folgende T-Konzentrationen: 2o d: 9,1 ng, 35 d: 12,2 ng, 45 d: 43,o ng und 9o d: 55,7 ng. Resko et al. (5o) entdecken bei 3o Tage alten Ratten 5 ng T und 5 ng Δ-4 pro g Hodengewebe und bei 9o-tägigen Tieren 53 ng T/g und 15 ng Δ-4/g. Nach den oben aufgeführten Bestimmungen übertrift die im Experiment zugegebene ^{14}C-T-Menge (s. o. 4326 ng) um das 1oo- bis 2oo-fache die endogene T-Menge, welche dadurch in der Betrachtung als zusätzliches Substrat vernachlässigt werden kann. Die in der vorliegenden Arbeit zugegebene ^{3}H-Δ-4-Menge (s. o. 23,8 ng) liegt im Bereich des endogenen Δ-4, wodurch endogene Δ-4-Schwankungen zu einem unterschiedlichen Substratangebot führen müssen.

Bei einer Inkubation von Hodengewebe ohne jeglichen T-Zusatz findet Lacroix (35) nach 2 Stunden ein endogen produziertes T von 54 ng/g Hodengewebe und Saksena et al. (56) gleichfalls nach 2 Stunden ein T von 93 ng/g. Bourne stellt im Vergleich zu Kontrolltieren durch die hCG-Stimulation eine 8-fache Zunahme der T-Produktion fest (63o ng T/Hoden/4 Stunden) und Carmichael weist durch superaktive LH-RH-Gabe mit 1o µg/erw. Ratte in vivo einen Anstieg der testikulären T-Konzentration

auf ca 6oo ng/g Hodengewebe nach. Aus diesen Ergebnissen darf gefolgert werden, daß durch die superaktive LH-RH-Stimulation (im Experiment mit rund 1 µg/erw. Ratte) die endogen erzeugte T- resp. Δ-4-Menge ein wesentliches zusätzliches Substrat für die ^{14}C-T-Inkubation darstellen kann.
Aus der N-, L-, S- und SS-Behandlung resultieren also wahrscheinlich unterschiedliche Enzym-Substrat-Sättigungen, die sich auf die Menge an wiedergefundener Radioaktivität der Metabolite ausgewirkt haben könnten. So könnte eine Abnahme des Metabolismus entdeckt werden, obwohl der totale Umsatz zugenommen hat. Beispiel: bei den 9o Tage alten Tieren beträgt in der N-Gruppe das ^{14}C-DIOL 3,4o%, in der SS-Gruppe dagegen 1,93%. Nach diesen Prozentwerten erscheint die Biokonversion des ^{14}C-T zu DIOL in der SS-Gruppe geringer als in der Kontrollgruppe zu sein. Wird aber die Menge des endogenen T - durch die Stimulation in der SS-Gruppe sehr viel höher als in der N-Gruppe - mitbetrachtet, so wird bei gleicher Zugabe an ^{14}C-T in der SS-Gruppe relativ weniger aktives T umgesetzt, da die Enzyme nicht zwischen endogenen und radioaktivem T unterscheiden.
Aber wie Rager in der Diskussion einer Arbeit belegt (49) wird durch die verschieden hohe Substratzugabe das altersabhängige Muster der Metabolisierung - die pubertierenden Ratten (35 Tage alt) weisen die höchsten 5α-reduzierten Metabolite auf - nicht verändert.

ad Extraktion und chromatographische Trennung:

Vgl. dazu III, 3.6 Validität der Methode

Zu Beginn der Extraktion wurden nicht radioaktive Carriersteroide dem Inkubationsgemisch zugesetzt; gleich verfuhr z. B. Matsumoto (38). Die meisten Autoren gaben vor der Extraktion anders als das Substrat markierte Carriersteroide hinzu (ist das Substrat ^{14}C-markiert, so sind die zugefügten Steroide ^{3}H-markiert und umgekehrt), um so die Verluste während den nach nachfolgenden Darstellungsschritten zu berechnen.
Im Experiment war dies durch die Konzeption der Doppelinku-

bation mit ^{3}H- und ^{14}C-Substrat nicht möglich. Um die Verluste eines jeden Metaboliten annähernd zu berücksichtigen, hätte man wie Gupta (26) und Rager (49) mit gekochtem Hodengewebe und jeweils nur einem markierten Metaboliten die Extraktions- und Trennungsprozedur durchführen sollen. Beide Autoren finden für jeden einzelnen Metaboliten eine Recovery um 85%. Rivarola (52) führt, wie in der vorliegenden Studie (s. Tab. 2), Kontrollinkubationen ohne Gewebezusatz durch.

Die Recovery des Experiments (59,52% für ^{3}H-Δ-4 und 55,o5% für ^{14}C-T) gleicht Folmans Recovery (16), die bei ihm für ^{3}H-T zwischen 52% und 68% schwankt. Nübel (45) erreicht mit der gleichen Methode für ^{3}H-Pregnenolon eine Recovery von 45% bis 54%.

2.2 Bewertung der Biokonversion

Die Biokonversion von ^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T unterliegt unter den gewählten Bedingungen einem hochsignifikanten Wandel in den verschiedenen Altersstufen. Die höchste Stoffwechselaktivität zeigen die 35 Tage alten Ratten, die am höchsten die Ausgangssubstrate metabolisieren (s. Tab. 13) und die den höchsten Prozentsatz der 5α-reduzierten Produkte (bei ^{3}H-Δ-4 von 59,8o% bis 8o,8o% und bei ^{14}C-T von 69,3o% bis 87,34%) aufweisen. Die präpubertären 2o Tage alten sowie die postpubertären 5o Tage alten Ratten verstoffwechseln in etwa gleich die Substrate, wobei die Prozentwerte der 5α-reduzierten Produkte in der Größenordnung von 3o% liegen. Bei den 9o-tägigen Ratten findet man nur noch etwa 5% 5α-reduzierter Metabolite, dagegen um 7o% T und um 15% Δ-4.

^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T wird in jeder Altersstufe und bei jeder Behandlungsart annähernd im gleichen Verhältnis zu den 5α-reduzierten Androgenen metabolisiert. Man darf daraus schließen, daß ^{3}H-Δ-4 sehr rasch zu T und weiter im 17-Hydroxy-Weg metabolisiert wird. Die Präferenz dieses Stoffwechselwegs steht im Einvernehmen zu Shanies (6o), Steinberger (62), Tamm (65) und Folman (16).

Die Behandlungseffekte 3o Minuten nach der in-vivo-Stimulation lassen sich in der anschließenden Inkubation des Hodenhomogenats nur für das DHT statistisch signifikant sichern. Obwohl die Summe der 5α-reduzierten Metabolite keinen signifikanten Behandlungseffekt aufweist, so wird doch bei den 2o und 35 Tage alten Ratten durch die Releasing-Hormon-Gabe die Summe sowohl der ^{3}H- als auch ^{14}C-5α-reduzierten Metabolite gegenüber der Kontrolle um 1o% bis 2o% erhöht. Bei den 5o und 9o Tage alten Ratten wird durch die in-vivo-Vorbehandlung im Vergleich zur Kontrolle die Summe der 5α-reduzierten Metabolite geringfügig erniedrigt.

Viele Autoren demonstrieren ein starkes Auftreten der 5α-reduzierten Folgeprodukte des T bei präpubertären Ratten, welches ein Maximum bei pubertierenden Ratten erreicht und mit steigendem Alter wieder stark abnimmt (16,21,26,35,36,43,48,5o,52, 62,67).

Folman findet bei der ^{3}H-T-Inkubation mit Hodengewebe unreifer (45 Tage alter) Ratten, daß fast 9o% der wiedergefundenen Aktivität in Form von 5α-reduzierten Metaboliten vorliegt, und daß DIOL und DHT mehr als 1o-fach höher als bei den erwachsenen (9o Tage alten) Ratten angetroffen wird (15). In einer nachfolgenden Arbeit (16) stellt er im Gegensatz zu Rivarola (52) fest, daß die Tubuli seminiferi unreifer erwachsener Ratten den gleichen ^{3}H-T-Metabolismus zeigen und lediglich das interstitielle Gewebe bei den unreifen Ratten vermehrt DIOL und andere 5α-reduzierte Androgene bildet. Rivarola (52) sieht im Metabolismus von ^{14}C-T durch die Tubuli verschieden alter Ratten bis zum 12. Lebenstag keine Konversion zu DIOL, danach ein steiles Anwachsen der prozentualen Bildung von DIOL, maximal ab dem 2o. Lebenstag, bis zum 45. Lebenstag ein Plateau und danach ein deutliches Absinken des DIOL bis zum Erwachsenenalter hin. Der Übergang des Verhältnisses 5α-reduzierter Metabolite zu Testosteron ≤ 1 liegt bei Zais (67) im Alter zwischen 45 und 56 Tagen, d. h. ab diesem Zeitpunkt wird mehr T als 5α-reduzierte Steroide gebildet.

Bei Lacroix (35) wird das zugegebene ^{3}H-T zum größten Teil metabolisiert durch die Testes unreifer Ratten zwischen dem 2o.

und 6o. Lebenstag; weniger ausgeprägt ist der Metabolismus vor dem 2o. und ab dem 9o. Lebenstag. Im Alter bis zu 45 Tagen wird ^{3}H-T hauptsächlich zu 5α-reduzierten Produkten verstoffwechselt und nur wenig zu 7α-OH-Testosteron, während der Hoden erwachsener Ratten ^{3}H-T vorallem zu 7α-OH-T und kaum zu 5α-reduzierten Androgenen umbaut. Er schließt daraus, daß die Abnahme der Reduktaseaktivität während der Hodenreifung mit einer beinahe äquivalenten Zunahme des Hydroxylierungsvermögens von T verbunden ist.
Aus seinen Untersuchungen folgert Matsumoto (38), daß im Hoden unreifer Ratten (2o bis 41 Tage) die 5α-Reduktion von ^{3}H-T viel höher im interstitiellen Gewebe als in den Tubuli seminiferi ist, da nicht aufgetrenntes Hodenhomogenat sehr viel größere Mengen von T zu 5α-reduzierten Produkten reduzieren kann als die isolierten Tubuli alleine.
Steinberger und Ficher (62) finden sowohl durch die ^{3}H-Δ-4- als auch durch die ^{3}H-T-Inkubation im Hodengewebe der 2o Tage alten Ratten DIOL und A-steron als Hauptmetabolite vor; dagegen sind im Hodenhomogenat der 9o-tägigen Ratten kaum noch 5α-reduzierte Androgene zu finden. Nach ihrer Arbeit bewirken Rattenhoden im Alter von 2o bis 3o Tagen am effektivsten die Bildung 5α-reduzierter Metabolite.

Inzwischen gilt als gesichert, daß die in-vivo-Verabreichung von LH-RH (entspricht dem GnRH anderer Autoren) und seiner agonistischen Analoga paradoxerweise Antifertilitätseffekte in beiden Geschlechtern verschiedener Tierarten ausübt (2,4, 5,6,7,28,29,3o,53,54). In männlichen Ratten werden diese antigonadalen Effekte von LH-RH manifest als Abnahme der Anzahl testikulärer LH- und Prolactinrezeptoren, begleitet von einer verminderten Androgenproduktion, die in der Dysfunktion der Tubuli seminiferi gipfelt. Anfänglich wurden diese hemmenden Effekte des LH-RH als eine Folge der "down-regulation" (4) der LH-Rezeptoren angesehen als Ergebnis der exzessiven LH-Sekretion. Jedoch zeigen neuere Studien (2,28,3o), daß LH-RH auch in hypophysektomierten Tieren die LH-Rezeptoren reduziert und die T-Produktion hemmt. Der Nachweis für einen direkten

Effekt von LH-RH oder seiner Agonisten auf die testikuläre Funktion wurde erbracht, indem spezifische LH-RH-Rezeptoren in den Membranfraktionen des interstitiellen Hodengewebes gefunden wurden (5).
Durch die LH-RH-Gabe im Experiment kommen also mehrere Effekte in Gange, die es parallel zu betrachten gilt: zum einen werden aus der Hypophyse vermehrt LH und FSH freigestzt, die die Steroidsynthese stimulieren und den T-Metabolismus beeinflussen, zum andern wirken die Releasing Hormone auch direkt auf das testikuläre Gewebe. Nach Bourne et al. (5) und Cao et al. (7) steigt durch die Gabe von GnRH bzw. dessen Agonisten initial im Hoden hypophysektomierter Tiere die T-Produktion an und nimmt ab dem 2. Tag ab, woraus die Autoren folgern, daß die direkte antitestikuläre Aktion der Releasing Hormone ein bis zwei Tage dauert, um evident zu werden.

Hsueh und Mitarbeiter finden in Hodenzellkulturen unreifer hypophysektomierter Ratten überwiegend DIOL und A-steron, aber vernachlässigbar wenig Δ-4, T und DHT (3o). Die Inkubation ihrer Kulturen mit hCG und FSH ließ die DIOL- und A-steron-Produktion im Vergleich zur Kontrolle ansteigen. Jedoch hemmt im Gegensatz dazu die Zugabe von GnRH bzw. eines GnRH-Agonisten diesen stimulierenden Gonadotropineffekt in einer dosisabhängigen Weise: $1o^{-8}$ resp. $1o^{-6}$ Mol GnRH hemmen ab dem 4. Tag der Kulturinkubation die DIOL-Bildung um ca 2o% resp. 8o%.

Folman (16) injizierte 18 und 9 Stunden vor der Dekapitation 45 und 145 Tage alte Ratten entweder mit 25o IU LH oder 25o IU hCG oder 5oo µg FSH und inkubierte dann zerzupftes Hodengewebe mit ^{3}H-T für 2 Stunden. Er sieht verglichen mit der Kontrollgruppe: a) durch LH-Gabe keinen Effekt in der Bildung 5α-reduzierter Metabolite, b) durch die hCG-Gabe bei den unreifen Ratten eine signifikante Zunahme der 5α-reduzierten Androgene und c) durch die FSH-Injektion eine geringere Steigerung der DHT-Bildung bei den erwachsenen und keine Auswirkung im Metabolismus bei den unreifen Tieren. Ohne Effekt ist auch die direkte Zugabe der Gonadotropine ins Inkubationsmedium.

Gupta (26) findet am inkubierten Rattenhoden nach vorausge-

gangener 14-tägiger Behandlung der Tiere mit 1oo IE hCG bei präpubertären Ratten gegenüber der Kontrolle ein deutliches Abnehmen der 5α-reduzierten Metabolite bei gleichzeitigem Zunehmen von Δ-4, während die erwachsenen Ratten kaum Veränderungen im Metabolismus durch die hCG-Behandlung aufweisen.

Nayfeh (43) studierte den Effekt von Hypophysektomie und Gonadotropinbehandlung auf die 5α-Reduktaseaktivität im Hoden 3o Tage alter Ratten. Als Maß für die Aktivität der 5α-Reduktase ermittelte er die Summe aus DIOL, DHT und A-steron nach Inkubation des Hodenhomogenats mit ^{3}H-T. Er fand, daß die 5α-Reduktaseaktivität in vitro nach der Hypophysektomie abnimmt und wieder durch die in-vivo-Behandlung mit FSH oder LH zunimmt (über 4 Tage tägliche Injektion von 5oo µg FSH oder 3oo µg LH). Die 5α-Reduktase reagiert dabei auf LH und FSH auch in Abwesenheit von Keimzellen. Ferner erzeugte die FSH-Gabe einen geringeren Anstieg der 5α-reduzierten Metabolite als die LH-Gabe, und LH konnte schon in niedriger Dosierung die 5α-Reduktase im Hodenhomogenat aktivieren.

Carmichael (9) desensibilisierte erwachsene Ratten 8 Tage lang mit 1oo µg D-Ser^{6}-Gly-LH-RH-ethylamide und bestimmte am 9. Tag 2 Stunden nach LH-Gabe T und seine 5α-reduzierten Metabolite im Hoden und im Serum. Dabei stellte er einen 9o%-igen Abfall der T-Konzentration bei 8o%-igem Anstieg der DIOL-Spiegel fest. Er zog die Schlußfolgerung, daß die Behandlung die Aktivität der 5α-Reduktase und die der 3α-Oxidoreduktase steigerte.

Die folgende Tabelle mit Ergebnissen aus vergleichbaren Biokonversionsstudien anderer Autoren gestattet einen direkten Vergleich mit den Werten der vorliegenden Studie.

Tab. 18: Gegenüberstellung von Ergebnissen vergleichbarer Biokonversionsstudien mit den Werten des Experiments. Angaben in % wiedergefundener Radioaktivität.

					Werte des Experiments (Behandlung,Alter,Substrat)
Rivarola and Podesta (51):					
erw. 6o - 9o Tage alte R.		Tub. sem.		int. Gew.	(N,9o,^{14}C-T)
1-stündige Inkubation von	T	74		82	7o,9
Tubuli seminiferi und inter-	Δ-4	9		19	18,4
stitiellem Gewebe (≙ 6,3% des	DIOL	13		2	3,4
Hodengewichts) mit ^{14}C-T	DHT	3		2	o,4
Lloret and Weisz (36):					
		Tub. sem.		int. Gew.	(N,9o,^{14}C-T)
erw. 1oo - 12o Tage alte R.	T	82		66	7o,9
1-stündige Inkubation von	Δ-4	11		21	18,4
Tubuli seminiferi und	DIOL	3,8		o,21	3,4
interst. Gewebe mit ^{3}H-T	DHT	1,5		o,16	o,4
Rivarola et al. (52):					(N,2o,^{14}C-T)
a) Testes 2o Tage alter R.	T	DIOL	DHT	A-st	Δ-4	T	DIOL	DHT	A-st	Δ-4
für 3 h mit ^{14}C-T inkub.	4,7	5o,2	8,o	8,5	o,4	72,7	14,3	5,5	o,5	2,4
b) Tub. sem. versch. alter		2o d	4o d	6o-9o d			N,2o	N,35	N,9o	
R. für 2 h mit ^{14}C-T in-										
kubiert, nur DIOL best.	DIOL:	15	32	2o		DIOL:	14,3	5o,4	3,4	
Gupta et al. (26):			Ko	hCG		(N,^{3}H-Δ-4)	(L,^{3}H-Δ-4)
15 u. 9o Tage alte R.,	15d:	T	9,56	6,6o	2od:	39,69	49,36
2-stündige Inkubation		Δ-4	8,23	21,65		34,76	18,13
des Hodenhomogenats		DIOL	11,68	8,o6		9,88	14,35
mit ^{14}C-Progesteron		DHT	2,25	4,88		5,19	6,58
Ko = Kontrolle		A-st.	44,72	15,55		2,66	4,7o
hCG= 14-tägige Vorbe-	9od:	T	3o,77	36,84	9od:	65,52	7o,oo
handlung mit		Δ-4	16,64	17,84		18,72	11,o5
1oo IE hCG s.c.		DIOL	4,35	5,15		3,86	4,46
pro Tag		DHT	2,11	o,81		o,41	o,58
		A-st.	8,52	5,46		o,38	o,51
Folman et al. (16):			Ko	FSH	hCG	(N,^{14}C-T)	(L,^{14}C-T)	(S,^{14}C-T)
45 u. 145 Tage alte R.,	45d:	T	4,3	4,3	4,5	5od:	5o,o7	53,12	53,65
2-stündige Inkubation		Δ-4	o,6	o,6	o,6		8,31	1o,69	1o,44
von zerzupftem Hoden-		DIOL	46,2	44,6	56,6		27,53	22,35	18,46
gewebe mit ^{3}H-T,		DHT	34,6	32,7	22,1		5,99	5,o9	9,36
18 und 9 h vor Dekapi-		A-st.	3,o	4,4	5,3		3,29	4,13	3,o9
tation s.c.-Gabe der		DION	4,o	4,7	4,2		o,41	o,51	o,85
Gonadotropine	145d:	T	56,7	54,1	69,5	9od:	7o,98	75,79	78,34
Ko = Kontrolle		Δ-4	16,3	17,6	16,7		18,45	11,38	12,73
FSH= 45d: 5oo µg FSH		DIOL	4,6	4,7	2,4		3,4o	3,98	2,o6
145d: 1ooo µg FSH		DHT	2,8	3,1	1,2		o,43	o,62	o,69
hCG= 45d: 25o IU hCG		A-st.	o,9	1,o	o,5		o,4o	o,5o	o,46
145d: 5oo IU hCG		DION	o,6	o,7	o,3		o,1o	o,14	o,19

VI ZUSAMMENFASSUNG

Im vorliegenden Experiment wurde der Einfluß von LH-RH und einem superaktiven Analogon auf den Androgen-Metabolismus im Hoden 2o, 35, 5o und 9o Tage alter Ratten untersucht. Die zur Studie verwendeten 288 Ratten wurden dazu in 4 Behandlungsgruppen eingeteilt:

- N-Gruppe = Kontrollgruppe (i.p.-Injektion von physiologischer NaCl-Lösung)
- L-Gruppe (i.p.-Injektion von o,4 µg/1oog KG LH-RH)
- S-Gruppe (i.p.-Injektion von o,o4 µg/1oog KG des-Gly^{1o}-D-Ala^{6}-LH-RH-ethylamide)
- SS-Gruppe (i.p.-Injektion von o,4 µg/1oog KG des-Gly^{1o}-D-Ala^{6}-LH-RH-ethylamide)

3o Minuten nach der Releasing-Hormon-Gabe wurden die Tiere dekapitiert, FSH und LH im Serum bestimmt und das Hodenhomogenat 6o Minuten mit ^{3}H-Androstendion und ^{14}C-Testosteron inkubiert. Nach der Inkubation wurde die wiedergefundene Radioaktivität für T, Δ-4, DIOL, DHT, A-steron und DION gemessen. Die gewonnenen Ergebnisse wurden in einer zweifaktoriellen Varianzanalyse auf ihre Signifikanz überprüft.

Es können folgende Aussagen gemacht werden:

1) Die FSH- und LH-Serumspiegel zeigen sowohl einen statistisch signifikanten Altersstufen- als auch Behandlungseffekt:
   a) Die FSH-Werte weisen ein Maximum bei den 35 Tage alten Ratten auf. In der L- und S-Gruppe steigt das FSH stets signifikant an, wobei die L- und S-Werte auf dem gleichen Signifikanzniveau liegen. Durch die SS-Behandlung kommt es zu einem weiteren Anstieg bei den 2o- und 35-tägigen Ratten.
   b) Die LH-Werte zeigen keinen altersabhängigen Gipfel. In der L- und S-Gruppe findet sich in jedem Alter ein fast identischer Anstieg des LH. Die SS-Stimulation erzeugt bei den 2o, 35 und 5o Tage alten Ratten noch eine weitere signifikante Steigerung des Serum-LH.

2) Des-Gly^{10}-D-Ala^{6}-LH-RH-ethylamide besitzt im Vergleich zu LH-RH eine ca. 1o-fach stärkere biologische Aktivität.

3) Mit der angewandten Methode werden 65% bis 94% des zugefügten ^{3}H-Δ-4 (im Durchschnitt 85,44%) metabolisiert, während 21% bis 9o% des inkubierten ^{14}C-T (im Durchschnitt 47,95%) verstoffwechselt werden. Dennoch gleicht sich stets das gefundene Verhältnis der Hauptmetabolite beider Substrate zueinander in den einzelnen Altersstufen und jeweiligen Behandlungsarten (^{3}H-T : ^{3}H-DHT : ^{3}H-DIOL ≈ ^{14}C-T : ^{14}C-DHT : ^{14}C-DIOL).

4) Die Biokonversion von ^{3}H-Δ-4 und ^{14}C-T unterliegt einem hochsignifikanten Wandel in den verschiedenen Altersstufen. Die höchste Stoffwechselaktivität (5α-red. Metabolite bis zu 87%) zeigen die pubertierenden 35 Tage alten Ratten. Die präpubertären 2o Tage alten sowie die postpubertären 5o Tage alten Ratten verstoffwechseln in etwa gleich die Substrate (5α-red. Metabolite in der Größenordnung von 3o%). Bei den 9o-tägigen Ratten liegen die Werte der 5α-reduzierten Metabolite bei 5%; dafür weist diese Altersstufe den höchsten Prozentsatz an wiedergefundener Radioaktivität von T (um 7o%) und Δ-4 (um 15%) auf.

5) Für die 5α-reduzierten Metabolite läßt sich ein altersabhängiges Verteilungsmuster feststellen, das sich auch unter der Behandlung kaum verändert: Stets wird das DIOL mit grossem Abstand an erster Stelle wiedergefunden und bildet die Hälfte bis vier Fünftel der 5α-reduzierten Metabolite. An zweiter Stelle rangiert das DHT, welches ein Drittel bis ein Zehntel der 5α-reduzierten Androgene ausmacht. Etwas weniger als DHT wird A-steron entdeckt. DION wird in vernachlässigbar geringen Mengen gefunden.

6) Ein signifikanter Behandlungseffekt durch die Releasing-Hormon-Gabe läßt sich nur für das gebildete ^{3}H- und ^{14}C-DHT nachweisen. DHT wird vermehrt produziert: bei den 35 Tage alten Ratten weist die SS-Gruppe am meisten DHT auf, während in allen anderen Altersstufen die S-Gruppe das höchste DHT zeigt.

7) Durch die Behandlung kann keine signifikante Stimulationstendenz im Androgenmetabolismus der Ratten festgestellt werden. Auch für die Summe der 5α-reduzierten Metabolite findet sich kein signifikanter Behandlungseffekt, doch steigt bei den 2o Tage alten Ratten die Summe sowohl der ^{3}H- als auch ^{14}C-5α-reduzierten Steroide gegenüber der Kontrolle in der L- und SS-Gruppe um die Hälfte und in der S-Gruppe um das Doppelte an. Bei den 35 Tage alten Tieren erhöht sich diese Summe gegenüber der Kontrolle in der L-Gruppe um ein Sechstel und in der SS-Gruppe um ein Drittel, während sie in der S-Gruppe um ein Zehntel abfällt. Bei den 5o-tägigen Ratten wird durch die L- und S-Behandlung die Summe der 5α-reduzierten Metabolite beider Substrate im Vergleich zur Kontrolle um ein Sechstel erniedrigt, durch die SS-Behandlung um ein Achtzehntel. Die Summe wächst bei den 9o Tage alten Versuchstieren in der L-Gruppe um ein Fünftel und verringert sich in der S- und SS-Gruppe ebenfalls um ein Fünftel. Alle aufgeführten Veränderungen beruhen vorallem auf der Variation in der wiedergefundenen DIOL-Konzentration.

8) Der Quotient aus nicht reduzierten Steroiden (T + Δ-4) zur Summe der 5α-reduzierten Steroide zeigt für beide Substrate in allen 4 Behandlungsgruppen einen ähnlichen altersabhängigen Kurvenverlauf.

VII VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

A-steron	Androsteron (3α-Hydroxy-5α-androstanon-7)
cpm	counts per minute
c/1o'	counts pro 1o Minuten
^{14}C-T	4-^{14}C-Testosteron
Δ-4	Androstendion (4-Androsten-3,17-dion)
DHT	Dihydrotestosteron (5α-Androstan-17β-Hydroxy-3-on)
DIOL	Androstandiol (5α-Androstan-3α,17β-diol)
DION	Androstandion (5α-Androstan-3,17-dion)
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
hCG	humanes Choriogonadotropin
^{3}H-Δ-4	1,2-^{3}H-Androstendion
LH	Luteinisierendes Hormon
LH-RH	Luteinisierendes Hormon-releasing hormone
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
T	Testosteron (17β-Hydroxyandrosten-4-on-3)

VIII LITERATURVERZEICHNIS

1 ARIMURA, A., M. SAITO, Y. YAOI, T. KUMASAKA, H. SATO, T. KOYAMA, N. NISHI, A. J. KASTIN, and A. V. SCHALLY:
Comparison of the effects of subcutaneous and intravenous injection of synthetic LH-RH on serum LH and FSH levels in men
J Clin Endo Metab, 36, 385 - 388, 1973

2 BADGER, T. M., I. Z. BEITINS, T. OSTREA, J. M. CRISAFULLY, R. LITTLE, and M. E. SAIDEL:
Luteinizing hormone-releasing hormone does not inhibit Testosterone production in rat interstitial cells in vitro
Endo, 1o6, 1149 - 1153, 198o

3 BAUR, K. E.:
Hypophysäre Androgen-Biokonversion und Serum-Gonadotropin-spiegel bei männlichen Ratten: Einfluß von sexuellem Reifungsgrad und Behandlung mit LHRH und einem seiner Analogen
Med. Diss., Tübingen, 1984 (in Vorbereitung)

4 BELANGER, A., C. AUCLAIR, C. SEGUIN, P. A. KELLY and F. LABRIE:
Down-regulation of testicular androgen biosynthesis and LH-receptor levels by an LHRH agonist: role of Prolactin:
Mol Cell Endo, 13, 47 - 53, 1979

5 BOURNE, G. A., M. R. DOCKRILL, S. REGIANI, J. C. MARSHALL, and A. H. PAYNE:
Induction of testicular Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors by GnRH: effects of pituitary hormones and relationship to inhibition of Testosterone production
Endo, 11o, 727 - 733, 1982

6 BOWERS, C. Y., J. HUMPHRIES, T. WASIAK, K. FOLKERS, G. A. REYNOLDS, and L. E. REICHERT, jr.:
On the inhibitory effects of Luteinizing hormone-releasing

hormone analogs
Endo, 1o6, 674 - 683, 198o

7 CAO, Y. Q., K. SUNDARAM, C. W. BARDIN, J. RIVIERS, W. VALE:
Direct inhibition of testicular steroidogenesis and gonadotrophin receptor levels by ((imBzl)-D-His6, Pro9-NEt) GnRH and (D-Trp6, Pro9-NEt) GnRH, potent agonists of GnRH
Int J Androl, 5, 158 - 17o, 1982

8 CARATY, A., M. M. de REVIERS, N. MARTINAT, M. R. BLANC:
A reinvestigation of hypothalamic-pituitary testicular interactions: simultaneous changes in tissue and plasma levels of gonadotrophins, prolactin, testosterone and hypothalamic LH-RH after bilateral orchidectomy and cryptorchidism
Reprod Nutr Develop, 21, 455 - 465, 1981

9 CARMICHAEL, R., A. BELANGER, L. CUSAN, C. SEGUIN, S. CARON, and F. LABRIE:
Increased testicular 5α-androstane-3α, 17β-diol formation induced by treatment with (D-Ser(Tbu)6, Des-Gly-$NH_2$1o) LHRH ethylamide in the rat
Steroids, 36, 383 - 391, 198o

1o COY, D. H., E. J. COY, A. V. SCHALLY, J. VILCHEZ-MARTINEZ, Y. HIROTSU, and A. ARIMURA:
Synthesis and biological properties of (D-Ala-6, Des-Gly-NH_2-1o)-LH-RH ethylamide, a peptide with greatly enhanced LH- and FSH-releasing activity
Biochem and Biophys research comm, 57, 335 - 34o, 1974

11 CUSAN, L., C. AUCLAIR, A. BELANGER, L. FERLAND, P. A. KELLY, C. SEGUIN, and F. LABRIE:
Inhibitory effects of long term treatment with a Luteinizing hormone-releasing hormone agonist on the pituitary-gonadal axis in male and female rats
Endo, 1o4, 1369 - 1376, 1979

12 DEBELJUK, L., A. ARIMURA, and A. V. SCHALLY:
Studies on the pituitary responsiveness to Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in intact male rats of different ages
Endo, 9o, 585 - 588, 1972

13 DUFAU, M. L., and K. J. CATT:
Gonadotropin receptors and regulation of steroidgenesis in the testis and ovary
Vitamins and Hormones, Vol 36, 461 - 585, 1978

14 ECKERT, H. G.:
Die Technik des Radioimmunassays
Angew. Chemie, 17, 565 - 574, 1976

15 FOLMAN, Y., N. AHMAD, J. G. SOWELL, and K. B. EIK-NES:
Formation in vitro of 5α-Dihydrotestosterone and other 5 -reduced metabolites of ^{3}H-Testosterone by the seminiferous tubules and interstitial tissue from immature and mature rat testes
Endo, 92, 41 - 47, 1973

16 FOLMAN, Y., J. G. SOWELL, and K. B. EIK-NES:
The presence and formation of 5α-Dihydrotestosterone in rat testes in vivo and in vitro
Endo, 91, 7o2 - 71o, 1972

17 FREDERIKSEN D. W. and J. D. WILSON:
Partial characterization of the nuclear reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate: Δ^{4}-3-Ketosteroid 5α-Oxidoreductase of rat prostate
Journal of Biological Chemistry, Vol 246, 2584 -2593, 1971

18 GEIGER, R., N. KÖNIG, H. WISSMANN, K. GEISEN, and F. ENZMANN:
Synthesis and characterization of a decapeptide having LH-RH/FSH-RH activity
Biochem. and Biophys. research comm., 45, 767 - 773, 1971

19 GOLMAN, B. D., Y. R. GRAZIA, I. A. KAMBERI, and J. C. PORTER:
Serum gonadotropins concentrations in intact and castrated neonatal rats
Endo, 88, 771 - 776, 1971

2o GREENWOOD, F. C., W. M. HUNTER, and T. S. GLOVER:
The preparation of 131 I-labelled human growht hormone of high specific radioactivity
Biochem J, 89, 114 - 123, 1963

21 GUPTA, D., K. RAGER, A. ATTANASIO, W. KLEMM, and M. EICHNER:
Sex steroid hormones during multiphase pubertal developments
J Steroid Biochemistry, 6, 859 - 868, 1975

22 GUPTA, D., and M. EICHNER:
An appraisal of the male hypothalamo-hypophyseal axis in the rat during sexual maturation
in: Hypothalamic Hormones-Chemistry, Physiology and Chemical Applications. Editors: Gupta/Voelter: Verlag Chemie, Weinheim-New York, S. 257 - 285, 1978

23 GUPTA, D., K. RAGER, J. ZARZYCKI, and M. EICHNER:
Levels of Luteinizing hormone, Follicle-Stimulating hormone, Testosterone and Dihydrotestosterone in the circulation of sexually maturing intact male rats and after orchidectomy and experimental bilateral cryptorchidism
J Endocr, 66, 183 - 193, 1975

24 GUPTA, D., and M. EICHNER:
Age related changes in pituitary responsiveness to Luteinizing hormone-releasing hormone in the male rat
Res exp Med, 17o, 289 - 293, 1977

25 GUPTA, D.:
Inhärente Tendenz zur Weiblichkeit
Sexualmedizin, 3, 68 - 74, 1974

26 GUPTA, D., K. RAGER, G. PFISTER, and W. VOGT:
Bioconversion of the precursors by pre- and post-pubertal rat testes with special reference to local irradiation and gonadotropin stimulation
Steroids, 21, 17 - 26, 1973

27 GUPTA, D., W. KLEMM, and M. EICHNER:
Augmentation of the in vitro pituitary biotransformation of Testosterone due to orchidectomy and its relation to serum gonadotropins in the rat
Res exp Med, 172, 239 - 246, 1978

28 HEBER , D., and R. S. SWERDLOFF:
Gonadotropin-releasing hormone analog and Testosterone synergistically inhibit spermatogenesis
Endo, 1o8, 2o19 - 2o21, 1981

29 HIEROWSKI, M. T., A. J. WARING, and A. V. SCHALLY:
Synthesis and degradation of cyclic nucleotides in the pituitary gland, ovary and testis of rats treated with D-Trp^{6}-Luteinizing hormone-releasing hormone
Biochemica et Biophysica Acta, 675, 232 - 238, 1981

3o HSUEH, A. J., J. R. SCHREIBER, G. F. ERICKSON:
Inhibitory effect of gonadotropin releasing hormone upon cultured testicular cells
Mol Cell Endocrinol, 21, 43 - 49, 1981

31 INANO, H., Y. HORI, and B. TAMAOKI:
Effect of age on testicular enzymes related to steroid bioconversion
Colloquia on Endocronology, 16, 1o5 - 119, 1967

32 JAUCH, H.:
Biotransformation von Progesteron in Androgene bei normalen und kryptorchen Ratten verschiedener Altersstufen
Med. Diss. Tübingen, 1976

33 JETTER, E.:
Gonadotropinbestimmung im Plasma nach LH-RH-Stimulation vor und nach der Pubertät
Med. Diss., Tübingen, 1976

34 KAMEL, F., and L. C. KREY:
Intracellular receptors mediate gonadal steroid modulation of LH-RH-induced LH release
Mol Cell Endo, 28, 471 - 486, 1982

35 LACROIX, E., W. EECHAUTE, and I. LEUSEN:
Influence of age on the formation of 5α-androstanediol and 7α-hydroxy-testosterone by incubated rat testes
Steroids, 25, 649 - 661, 1975

36 LLORET, A. P., and J. WEISZ:
Metabolism of Testosterone and 5α-Dihydrotestosterone in vitro by seminiferous tubules of the mature rat
Endo, 95, 13o6 - 1316, 1974

37 MASSA, R. E., E. STUPNICKA, Z. KNIEWALD, and L. MARTINI:
The transformation of Testosterone into Dihydrotestosterone by brain and the anterior pituitary
J Steroid Biochemistry, 3, 385 - 399, 1972

38 MATSUMOTO, K., and M. YAMADA:
5α-reduction of Testosterone in vitro by rat seminiferous tubules and whole testes at different stages of development
Endo, 93, 253 - 255, 1973

39 MAYRHOFER, H.:
Einfluß von chronischer Dihydrotestosteronbehandlung auf das körperliche Wachstum und die hypophysären Gonadotropine unter LH-RH bei männlichen Ratten
Med. Diss., Tübingen, 1978

4o MIYACHI, Y., E. NIESCHLAG, and M. B. LIPSETT:
The secretion of gonadotropins and Testosterone by the neonatal male rat
Endo, 92, 1 - 5, 1973

41 MONROE, S. E., A. F. PARLOW, and A. R. MIDGLEY, jr.:
Radioimmunassay for rat Luteinizing hormone
Endo, 83, 1oo4 - 1o12, 1968

42 NAIR, R. M. G., J. SAGEL, J. A. COLWELL, R. S. MATHUR, J. M. POWERS, J. L. LUBORSKY-MOORE, and W. C. WORTHINGTON:
Modern concepts on the structure-activity relationships and the mechanism of action of gonadotropin-releasing hormone and its superactive analogues
in: Hypothalamic Hormones-Chemistry, Physiology and Chemical Applications. Editors: Gupta/Voelter: Verlag Chemie, Weinheim-New York, S. 21 - 45, 1978

43 NAYFEH, S. N., C. COFFEY, N. J. KOTITE, and F. S. FRENCH:
Gonadotropic regulation of 5α-reductase activity in the interstitial cells and whole testis homogenate of the immature rat
Curr Top Mol Endocrin, 2, 53 - 64, 1975

44 NAYFEH, S. N., and B. BAGGETT:
Metabolism of Progesterone by rat testicular homogenates. I. Isolation and identification of metabolites
Endo, 78, 46o - 47o, 1966

45 NÜBEL, K. B.:
In vitro-Biokonversion von Pregnenolon bei normalen und artifiziell kurzzeitig kryptorchen Ratten während der Reifeperiode
Med. Diss., Tübingen, 1977

46 ODELL, W. D., R. S. SWERDLOFF, J. BAIN, F. WOLLESEN, and P. K. GROVER:
The effect of sexual maturation on testicular response to LH stimulation of Testosterone secretion in the intact rat
Endo, 95, 138o - 1384, 1974

47 ODELL, W. D., and R. S. SWERDLOFF:
The role of the testicular sensitivity to gonadotropins in sexual maturation of the male rat
J Steroid Biochem, 6, 853 - 857, 1975

48 PODESTA, E. J., and M. A. RIVAROLA:
Concentration of androgens in whole testis, seminiferous tubules and interstitial tissue of rats at different stages of development
Endo, 95, 455 - 461, 1974

49 RAGER, K., E. ARNOLD, A. HAUSCHILD, and D. Gupta:
Effect of bilateral cryptorchidism on the in vitro transformation of progesterone by testicular tissue at different stages of sexual maturation
J Steroid Biochem, 6, 1537 - 1541, 1975

5o RESKO, J. A., H. H. FEDER, and R. W. GOY:
Androgen concentrations in plasma and testis of developing rats
J Endocr, 4o, 485 - 491, 1968

51 RIVAROLA, M. A., and E. J. PODESTA:
Metabolism of Testosterone-^{14}C by seminiferous tubules of mature rats: formation of 5α-Androstan-3α,17β-diol-^{14}C
Endo, 9o, 618 - 623, 1972

52 RIVAROLA, M. A., E. J. PODESTA, and H. E. CHEMES:
In vitro Testosterone-^{14}C metabolism by rat seminiferous tubules at different stages of development: formation of 5α-Androstandiol at Meiosis
Endo, 91, 537 - 542, 1972

53 RIVIER, C., J. RIVIER, W. VALE:
Chronic effects of (D-TRP6, PRO9-NET) Luteinizing hormone-releasing factor on reproductive processes in the male rat
Endo, 1o5, 1191 - 12o1, 1979

54 ROMMERTS, F.F., and A. O. BRINKMAN:
Modulation of steroidogenetic activities in testis leydig cells
Mol Cell Endocrinol, 21, 15 - 18, 1981

55 ROOT, A. W., and R. D. RUSS:
Short-term effects of castration and starvation upon pituitary and serum levels of Luteinizing hormone and Follicel Stimulation hormone in male rats
Acta Endocr, 7o, 665 - 675, 1972

56 SAKSENA, S. K., I. F. LAU, and M. C. CHANG:
The inhibition of the conversion of Testosterone into 5α-Dihydrotestosterone in the productive organs of the male rat
Steroids, 27, 751 - 757, 1976

57 SCHALLY, A. V., A. ARIMURA, A. J. KASTIN, H. MATSUO, Y. BABA, T. W. REDDING, R. M. G. NAIR, L. DEBELJUK, and W. F. WHITE:
Gonadotropin-releasing hormone one polypeptide regulates secretion of Luteinizing and Follicle Stimulating Hormones
Science, 173, 1o36 - 1o38, 1971

58 SCHALLY, A. V., D. H. COY, J. VICHEZ, T. W. REDDING, and A. J. KASTIN:
Survey of the structure, synthesis and biological activity of hypothalamic releasing and inhibiting hormones
in: Hypothalamic Hormones-Chemistry, Physiology and Chemical Applications. Editors: Gupta/Voelter: Verlag Chemie, Weinheim-New York, S. 3 - 7, 1978

59 SCHALLY, A. V., A. ARIMURA, Y. BABA, R. M. G. NAIR, T. W. REDDING, L. DEBELJUK:
Isolation and properities of the FSH and LH-Releasing Hormone
Biochem and Biophys research comm, 43, 393 - 399, 1971

6o SHANIES, D. D., K. HIRSCHHORN, and M. I. NEW:
Metabolism of Testosterone-^{14}C by cultured human cells
J Clin Invest, 51, 1459 - 1467, 1972

61 STAHL, E. (Hrsg.):
Dünnschichtchromatographie, ein Laboratoriumshandbuch
2. Aufl., Verlag Springer, 1967

62 STEINBERGER, E., and M. FICHER:
Formation and metabolism of Testosterone in testicular tissue of immature rats
Endo, 89, 679 - 684, 1971

63 SWERDLOFF, R. S., P. C. WALSH, H. S. JACOBS and W. D. ODELL:
Serum LH and FSH during sexual maturation in the male rat: effect of castration and cryptorchidism
Endo, 88, 12o - 128, 1971

64 SWIFT, A. D., and D. B. CRIGHTON:
Relative activity, plasma elimination and tissue degradation of synthetic Luteinizing hormone releasing hormone and certain of its analogues
J Endocr, 8o, 141 - 152, 1979

65 TAMM, J.:
Testis
in: Klinische Pathophysiologie. Herausgeber: W. Siegenthaler, Thieme Verlag Stuttgart, 413 - 434, 1982

66 VALE, W., C. RIVIER, M. BROWN, J. LEPPALUOTO, N. LING, M. MONAHAN, and J. RIVIER:
Pharmacology of hypothalamic regulatory peptides
Clinical Endocrinology, 5, 261 - 273, 1976

67 ZAIS, R.:
Veränderungen der 5α-reduzierten Metabolite von Testosteron nach HCG-Stimulation und PMS-Vorbehandlung in Ratten während der geschlechtlichen Reife
Med. Diss., Tübingen, 198o

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. D. Gupta, Direktor der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik von Hormon- und Stoffwechselstörungen an der Universitätskinderklinik Tübingen (Ärztl. Direktor Prof. Dr. J. Bierich), danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor und für die gewährte Unterstützung.

Danken möchte ich auch Dipl. Biochem. Dr. med. W. Blum für die bereitwillige Hilfe bei der Durchführung des Radioimmunassays. Besonders danken möchte ich Dipl. Biochem. und Arzt B. Blank für die wertvollen Hinweise bei anstehenden Problemen und für die statistische Berechnung der Versuchsergebnisse.
Mein Dank gilt auch den MTAs des Hormonlabors, insbesondere Fr. Gabi Munding und Fr. Ingrid Balke, dem Tierpfleger Hr. Rein und dem Herrn von der Werkstatt Hr. Reutter für die freundlich erwiesenen kleinen Dienste, die das Experiment reibungslos voranschreiten ließen.
Einen ganz besonderen Dank möchte ich meinem Studienkameraden Karl Baur aussprechen, der mir während der gesamten Arbeit nützliche Anregungen gab.
Nicht zuletzt danke ich meinem Nachbarn Hr. Wagner für seine Mithilfe bei der Erstellung der Diagramme.

LEBENSLAUF

Am 28. Juli 1954 wurde ich, Albert Josef Braun, als Sohn des Landwirts Karl Braun und der Maria Braun, geb. Dreher, in Riedlingen geboren.
Von 1961 bis 1965 besuchte ich die Grundschule Riedlingen und anschließend den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zug des Kreisgymnasiums Riedlingen, wo ich am 7. Juni 1973 die Reifeprüfung ablegte. Von Juli 1973 bis April 1974 diente ich als Sanitätssoldat in der Bundeswehr und bin seit August 1977 als Kriegsdienstverweigerer anerkannt.
Im Sommersemester 1974 begann ich an der Universität Tübingen mit dem Studium der Medizin. Die Ärztliche Vorprüfung, den Ersten Abschnitt und den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestand ich im April 1976, im April 1977 und im April 198o. Über ein Stipendium des DAAD war es mir möglich von November 1978 bis Juli 1979 in London am King's College Hospital und Guy's Hospital zu studieren. Zum Wintersemester 198o wechselte ich an die Universität Ulm und absolvierte das Praktische Jahr am St. Elisabethen-Krankenhaus in Ravensburg. Den Dritten Teil der Ärztlichen Prüfung legte ich am 16. Oktober 1981 ab.
Seit Mai 1981 bin ich mit Irmgard Braun, geb. Buck, verheiratet. Im Dezember 1982 kam unser Sohn Christoph Dominik zur Welt.

Seit Januar 1982 arbeite ich als Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin am St. Elisabethen-Krankenhaus in Ravensburg und strebe nun den Facharzt für Anästhesie an.